

*AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR MUND-, KIEFER- und GESICHTSCHIRURGIE
Univ.-Prof. Dr. med. Dr. med. dent. TORSTEN E. REICHERT
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG*

*CHARAKTERISIERUNG VON HUMANEM HEADCASE (HECA) UND SEINEN
ISOFORMEN IN NORMALEN KERATINOZYTEN UND IM ORALEN
PLATTENEPITHELKARZINOM*

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Maximilian Johann Krinner

2011

*AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR MUND-, KIEFER- und GESICHTSCHIRURGIE
Univ.-Prof. Dr. med. Dr. med. dent. TORSTEN E. REICHERT
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG*

*CHARAKTERISIERUNG VON HUMANEM HEADCASE (HECA) UND SEINEN
ISOFORMEN IN NORMALEN KERATINOZYTEN UND IM ORALEN
PLATTENEPITHELKARZINOM*

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnmedizin

der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Maximilian Johann Krinner

2011

Dekan:

Prof. Dr. Bernhard Weber

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Gottfried Schmalz

Tag der mündlichen Prüfung:

23.01.2012

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	8
1.1	Klinische Grundlagen eines oralen Plattenepithelkarzinoms.....	8
1.1.1	Epidemiologie	8
1.1.2	Klinik des oralen Plattenepithelkarzinoms	9
1.1.3	Vorläuferläsionen des oralen Plattenepithelkarzinoms	9
1.1.4	Risikofaktoren.....	10
1.1.5	Therapieansätze	11
1.2	Molekulare Mechanismen der Zelltransformation bei der Entstehung des oralen Plattenepithelkarzinoms	13
1.2.1	Grundlagen	13
1.2.2	Genetische Veränderungen beim OSCC.....	14
1.2.3	Humanes Papillomavirus	17
1.3	Nichtinvasive Diagnosemöglichkeiten.....	18
1.3.1	Grundlagen	18
1.3.2	Tumormarker.....	18
1.4	Entstehung verschiedener Proteinvarianten	21
1.4.1	Mechanismus des Spleißens.....	21
1.4.2	Alternatives Spleißen in Tumoren	23
1.4.3	Posttranslationale Modifikationen.....	24
1.4.4	Glykosylierung von Proteinen	26
1.5	Das <i>headcase</i> -Gen	27
1.5.1	Grundlagen	27
1.5.2	<i>headcase</i> in <i>Drosophila</i>	27
1.5.3	<i>HECA</i> im menschlichen Organismus.....	29
1.5.4	Molekulargenetische Grundlagen zu <i>HECA</i>	31
1.6	Ziele der Arbeit	34
2	Material und Methoden	35
2.1	Material	35
2.2	Verwendete Zelllinien	37
2.2.1	Kultur der Zelllinien	38
2.2.2	Herstellung von Proteinlysaten	39

2.2.2.1	Herstellung von Ganzzellproteinlysaten	39
2.2.2.2	Herstellung von Proteinlysaten in subzellulären Fraktionen	39
2.2.2.3	Messung der Proteinkonzentration	40
2.2.2.4	Behandlung der Proteinlysate mit Enzymen zur Deglykosylierung	41
2.2.2.5	Behandlung der Proteinlysate mit λ -Phosphatase zur Dephosphorylierung 42	
2.2.2.6	Differenzierung von humanen oralen Keratinozyten	42
2.3	Polymerasekettenreaktion (PCR) mit den entsprechenden Primerpaaren	43
2.3.1	PCR- Bedingungen	43
2.3.2	Agarose-Gelelektrophorese	44
2.3.3	Verwendete Primer	44
2.3.4	cDNA-Synthese	44
2.4	Quantitative PCR (qPCR).....	45
2.4.1	Theorie.....	45
2.4.2	Praktisches Vorgehen	46
2.4.3	Analyse der mRNA-Expression mittels relativer Quantifizierung.....	46
2.5	Immunoblot.....	47
2.5.1	Prinzip des spezifischen Proteinnachweises aus einer Proteinlösung	47
2.5.2	Praktisches Vorgehen	49
2.5.3	Densitometrische Auswertung	51
3	Ergebnisse	52
3.1	Analyse der Proteinexpression von <i>HECA</i> anhand von Immunoblots.....	52
3.1.1	Vergleich der Proteinexpression von humanen oralen Keratinozyten und verschiedenen Tumorzelllinien	52
3.1.2	Untersuchung der Expression der HECA-Proteinvarianten in den einzelnen subzellulären Fraktionen von humanen oralen Keratinozyten und Tumorzellen.....	53
3.1.3	Abhängigkeit der HECA-Expression von der Zelldifferenzierung	58
3.1.4	Nachweis von glykosylierten HECA-Proteinvarianten.....	61
3.1.5	Analyse von phosphorylierten HECA-Varianten in Ganzzellproteinlysaten und in subzellulären Proteinlysaten	63
3.2	Analyse der mRNA-Expression von HECA mittels qualitativer und quantitativer PCR	64
3.2.1	Untersuchung der mRNA-Expression des Volllänge-Transkripts vom <i>HECA</i> -Gen in normalen Keratinozyten und verschiedenen Tumorzelllinien	64
3.2.2	Analyse putativer Spleißvarianten der HECA-mRNA.....	66
4	Diskussion	74
4.1	Methodik	74

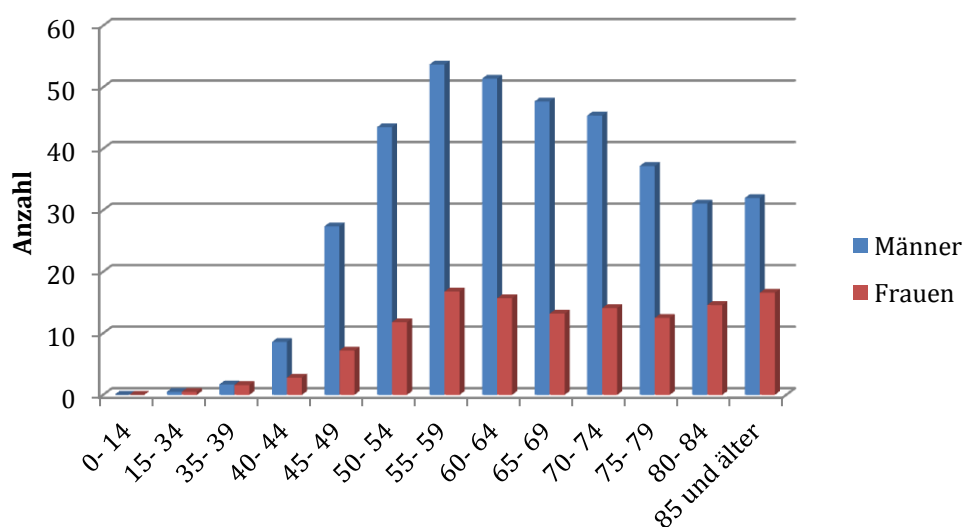
4.1.1	Angewandte Methodik zur Analyse des alternativen Spleißverhaltens von <i>HECA</i>	74
4.1.2	Angewandte Methodik zur Analyse der Proteinexpression von <i>HECA</i>	77
4.2	Nachweis unterschiedlicher <i>HECA</i> -Proteinvarianten	79
4.3	Expression des <i>HECA</i> -Proteins in den einzelnen subzellulären Fraktionen	81
4.4	<i>HECA</i> als Tumorsuppressor	84
4.5	<i>HECA</i> als Prognoseparameter	86
5	Zusammenfassung	88
6	Anhang	89
7	Literaturverzeichnis	93
8	Lebenslauf	112
9	Danksagung	113

1 Einleitung

1.1 Klinische Grundlagen eines oralen Plattenepithelkarzinoms

1.1.1 Epidemiologie

Das Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle zählt zu den Karzinomen des Kopf-Hals-Bereichs (head and neck squamous cell carcinoma: HNSCC), die weltweit die sechst häufigste Krebserkrankung darstellen (Argiris et al. 2008). Aufgrund ihrer nahezu identischen Ätiologie werden sie meist zusammen betrachtet, werden allerdings je nach ihrer Lokalisation von Mund-Kiefer-Gesichtschirurgen oder HNO-Ärzten behandelt. Diese Karzinome sind in der Mundhöhle und im Rachenraum lokalisiert. Die geschätzte Zahl jährlicher Neuerkrankungen liegt für 2010 in Deutschland bei 11400, wobei der Anteil der Männer mit ca. 8360 Erkrankungen nahezu dreimal so hoch ist wie der der Frauen mit 3040. Dabei liegen in Deutschland die Krebserkrankungen der Mundhöhle und des Rachens bei Männern mit einem Anteil von 3,5 % an allen Krebsformen hinsichtlich der Erkrankungshäufigkeit an siebter Stelle, bei Frauen mit 1,5 % an 16. Stelle. Bei Männern kam es 2006 in Deutschland dabei zu ca. 3623 Todesfällen, bei Frauen zu 1111. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei Männern bei 60 Jahren, bei Frauen bei 64, was im Vergleich zu anderen Tumoren relativ niedrig ist (Robert Koch Institut 2010).



Statistik 1: Schätzung der altersspezifischen Inzidenz eines malignen Karzinoms im Kopf-Hals-Bereich in Deutschland 2004, erfasst durch das Robert-Koch-Institut; Neuerkrankungen pro 100.000 in Altersgruppen.

1.1.2 Klinik des oralen Plattenepithelkarzinoms

Orale Plattenepithelkarzinome (*oral squamous cell carcinoma* = OSCC) treten überall im Bereich der Mundschleimhaut auf, wobei sie am häufigsten in der unteren Mundhöhlenetage vorkommen, besonders im Bereich des anterioren und lateralen Mundbodens, retromolar, am seitlichen Zungenrand und auch am Gaumenbogen. Klinisch manifestieren sie sich anfangs meist als schmerzlose Schleimhautveränderung. Es wird zwischen einem exophytischen und endophytischem Wachstum unterschieden. Bei beiden Formen liegt eine Induration des Gewebes vor, die nicht exakt von der Umgebung abgegrenzt werden kann (Schwenzer & Ehrenfeld, 2002).

95% aller malignen Tumoren der Mundhöhle sind Plattenepithelkarzinome, die histologisch in verruköses, spindelzelliges und adenosquamöses Karzinom sowie als basaloides und adenoides Plattenepithelkarzinom eingeteilt werden. Sie entwickeln sich auf dem Boden einer transformierten Zelle in der Basalzellschicht und ersetzen nach und nach das normale Epithel (Böcker et al. 2008). Von ihnen abgegrenzt werden müssen die Tumoren, die von den großen und kleinen Speicheldrüsen ausgehen und innerhalb oder unter der Schleimhaut wachsen.

1.1.3 Vorläuferläsionen des oralen Plattenepithelkarzinoms

Es gilt als gesichert, dass sich der Großteil der oralen Plattenepithelkarzinome aus präkanzerösen Läsionen entwickelt, von denen die orale Leukoplakie die häufigste ist (Wang et al. 2009). Nach WHO-Klassifikation ist die Leukoplakie eine klinische Beschreibung einer weißen, nicht wegwischtbaren Läsion, die keiner anderen Krankheit zugeordnet werden kann. Sie wird nochmals unterschieden in eine homogene und eine inhomogene Leukoplakie. Histologisch liegt bei einer Leukoplakie eine Hyperorthokeratose mit oder ohne Verhornungsstörung, sowie eine Akanthose mit oder ohne Dysplasie vor. Für eine Transformation einer Leukoplakie in ein malignes Plattenepithelkarzinom werden Werte zwischen 2 und 5 % angegeben (Hunter et al. 2005). Die Progression einer Leukoplakie in ein Karzinom hängt auch von den genetischen Veränderungen der Läsion ab. So sind in diesen präkanzerösen Läsionen bereits Verluste der Heterozygotie (LOHs) an den Genorten 3p, 9p und 17p nachgewiesen. Diese LOHs begünstigen den Übergang in ein Karzinom (Hunter et al. 2005; Smith et al. 2009; Zhang et al 2001).

Weitere präkanzeröse Läsionen sind der erosive Lichen planus, die proliferative verruköse Leukoplakie (PVL) sowie die Erythroleukoplakie (Beck-Mannagetta & Hutarew 2009). Die Erythroleukoplakie stellt eine Leukoplakie mit zusätzlichen rötlichen Schleimhautflecken dar. Es existiert auch eine alleinige Erythroplakie. Das Risiko einer malignen Entartung ist bei diesen Läsionen mit über 50 % gegenüber der gewöhnlichen Leukoplakie wesentlich erhöht (Hunter et al. 2005; Suter et al. 2009).

Die PVL ist eine Unterform der Leukoplakie, die klinisch der konventionellen Leukoplakie ähneln kann, sich allerdings durch ein aggressiveres und unnachgiebigeres Verhalten auszeichnet (Morton et al. 2007).

Zu den präkanzerösen Konditionen zählen der orale Lichen planus, die orale submuköse Fibrose (verursacht durch das Kauen von Betelnüssen vor allem in Asien), Syphilis im Tertiärstadium, Xeroderma pigmentosum, der Lupus erythematosus sowie die Epidermolysis bullosa dystrophica (Reichart 2003; Mithany et al. 2007).

1.1.4 Risikofaktoren

Als Hauptrisikofaktor für die Entstehung eines Plattenepithelkarzinoms in der Mundhöhle wird in der westlichen Welt der langjährige Konsum von Alkohol und Tabak betrachtet. In Indien und Südostasien zählt auch das Kauen von Betelnüssen zu den Hauptursachen. Für schwere Raucher unter 46 wird von einem bis zu 20-fach erhöhten Risiko für ein Oropharynxkarzinom ausgegangen, bei starken Trinkern von einem 5-fachen. Die Kombination von starkem Alkohol- und Tabakkonsum steigert das Risiko auf das 50-fache (Hunter et al. 2005).

Durch Tabak produzierte Karzinogene wie z.B. Benzapyrene und Nitrosamine führen zu Veränderungen im Genom von für das Entstehen eines HNSCCs wichtigen Genen wie p53. Die Rolle von Alkohol ist weniger klar. Man vermutet aber eine Wirkung als Kokarzinogen durch die Metabolisierung zu Acetaldehyd (Hunter et al. 2005).

Die orale Schleimhaut muss diesen Karzinogenen über einen langjährigen Zeitpunkt ausgesetzt sein. Dieser kanzerogene Prozess entsteht schließlich durch eine Beschädigung der DNA an mehreren Orten (van Oijen & Slootweg 2000; Biolchini et al. 2005). Da die gesamte Mundhöhle diesen Karzinogenen ausgesetzt ist, kommt es auch zum Phänomen der Feldkanzerisierung. Dies besagt, dass die gesamte epitheliale Oberfläche des oberen Verdauungstrakts geschädigt wird und somit ein höheres Risiko besitzt, maligne Läsionen zu entwickeln. Diese basieren auf multiplen genetischen Veränderungen im Gewebe der gesamten Region (van Oijen & Slootweg

2000).

Wird zudem nach einer erfolgten Therapie eines Karzinoms der Konsum von Alkohol und Nikotin durch den Patienten nicht eingestellt, führt dies zu einer erheblich schlechteren Prognose, die ein Rezidiv oder eine sekundäre Neoplasie begünstigt (León et al. 2009).

Es existieren allerdings auch Karzinome, die nicht mit den typischen Risikofaktoren Alkohol und Nikotin in Zusammenhang stehen. Für diese bis zu 25% der Fälle wird eine Infektion mit dem humanen Papillomavirus angenommen (Andrews et al. 2009). Schon länger ist die Rolle des humanen Papillomavirus (HPV) bei der Entstehung des Cervixkarzinoms bekannt (Moody & Laimins 2010).

Für ein Karzinom basierend auf dem humanen Papillomavirus werden andere Risikofaktoren angenommen als der übermäßige Konsum von Nikotin und Alkohol. Dabei sind vor allem junge Menschen betroffen, die eine höhere Anzahl an oralen Sexualpartnern aufweisen und vermehrt Marihuana konsumieren (Gillison et al. 2008; Haddad & Shin 2008). Das Risiko an einer HPV-induzierten Tumorerkrankung zu sterben ist höchstens halb so groß wie an einer konventionellen (Fakhry & Gillison 2006), auch aufgrund einem guten Ansprechen des Tumors auf Chemotherapie und Radiatio (Nguyen et al. 2009, Fakhry et al. 2008).

1.1.5 Therapieansätze

Bei Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle wird die Prognose des Krankheitsverlaufs meist anhand der TNM- Klassifikation gestellt. Im klinischen Befund müssen allerdings auch andere Parameter wie Alter, Geschlecht, frühere Erkrankungen usw. betrachtet werden (Baatenburg Jong et al. 2001). Histologisch ist der Differenzierungsgrad der wichtigste Faktor. Am wichtigsten für eine aussagekräftige Prognose sind aber die Tumorlokalisation, die Tumorgroße und der Lymphknotenstatus (Cojocariu et al. 2009). Zudem gelten die Invasion von Gefäßen, die Infiltration von Nerven und die Ausdehnung ins Weichgewebe als wichtige Faktoren.

Das Hauptziel bei der Entfernung eines Tumors ist das tumorfreie Überleben, wobei vitale Strukturen und Funktionen erhalten werden sollen. Dies gilt besonders für die anatomisch anspruchsvolle Region von Kopf und Hals. Dort werden wichtige Strukturen und Funktionen durch Karzinom und Therapie in Mitleidenschaft gezogen (Haddad & Shin 2008).

Es wird so gehandhabt, dass Patienten, die nach der UICC Stadieneinteilung in Stadium I oder II sind, meist nur mit einer Methode, also entweder chirurgisch oder mittels Radiatio, behandelt werden. Für weiter fortgeschrittene Stadien wird eine multimodale Therapie mit Bestrahlung, Chemotherapie oder Chirurgie empfohlen. In den Anfangsstadien können dabei sehr gute Therapieergebnisse erzielt werden (90 % bei Stadium I und 70 % bei Stadium II), allerdings besteht immer noch eine hohe Rezidivgefahr, weswegen regelmäßiges Recall notwendig ist (Haddad & Shin 2008; Shah & Gil 2009, Argiris et al. 2008). Dabei wird in der Mundhöhle meistens chirurgisch behandelt, um die späteren toxischen Folgen einer Bestrahlung zu vermeiden (Argiris et al. 2008). Da eine Metastasierung in die Lymphknoten einen häufigen Prozess beim oralen Plattenepithelkarzinom darstellt und dies auch mit einer Verschlechterung der Prognose einhergeht, muss in vielen Fällen auch eine Ausräumung der Lymphknoten durchgeführt werden. Diese ist notwendig, wenn bereits in der Staginguntersuchung befallene Lymphknoten festgestellt werden oder wenn aufgrund der Tumordicke und der Tiefe der Invasion solche vermutet werden (Argiris et al. 2008; Pentenero et al. 2005; Kane et al. 2006).

Patienten, die sich bereits in den UICC Stadien III und IV befinden, bedürfen neben der Chirurgie auch einer adjuvanten Therapie. Früher wurde als adjuvante Therapie immer eine Bestrahlungstherapie durchgeführt, wenn diese als notwendig erachtet wurde (Corvò 2007). Heute geht man davon aus, dass eine zusätzlich zur Radiatio durchgeführte Chemotherapie weiteren Heilungserfolg bringt (Bernier et al. 2004; Burri et al. 2009). Allerdings muss auch die zusätzliche toxische Wirkung betrachtet werden (Haddad & Shin 2008).

Eine neoadjuvante Chemotherapie verringert zudem das Auftreten von Fernmetastasen (Argiris et al. 2008; Haddad & Shin 2008).

Als Standardchemotherapeutikum wird dabei Cisplatin verwendet. Auch Cetuximab, ein Inhibitor des epithelialen Wachstumsfaktorrezeptors EGFR, erzielt sowohl als Einzeltherapeutikum als auch in Kombinationstherapie mit der Standardchemotherapie und/oder einer Radiatio gute Erfolge (Pan et al. 2009; Bernier & Schneider 2007). Diese Therapieform mit Cetuximab wird als *molecular-targeted* Therapie bezeichnet und es konnten bei *in vitro* Untersuchungen weitere viel versprechende Substanzen dieser Therapiegruppe aufgezeigt werden (Le Tourneau & Siu 2008). Dieses Verfahren einer kombinierten postoperativen Therapie wird vor allem bei Hochrisikopatienten angewendet. Es konnte so eine bessere lokale und regionale Tumorkontrolle gelingen, allerdings kam es durch den Mehreinsatz von Therapeutika zu vermehrten Nebenwirkungen (Cooper et al. 2004).

Ist der Tumor bereits soweit fortgeschritten, dass eine kurative Behandlung nicht mehr indiziert ist, wird palliativ behandelt. Dies sieht meist eine Bestrahlungstherapie vor, die als „Hypofractionation“ bezeichnet wird. Dabei wird die gewöhnliche Dosis der Radiatio in größere Dosen aufgeteilt und nicht jeden Tag bestrahlt. Durch diese Methode können gute Ergebnisse in Bezug auf das Ansprechen der Therapie, die Kontrolle der Symptome, das Toxizitätsprofil und die Lebensqualität erzielt werden (Al-mamgani et al. 2009; Agarwal et al. 2008).

1.2 Molekulare Mechanismen der Zelltransformation bei der Entstehung des oralen Plattenepithelkarzinoms

1.2.1 Grundlagen

Die Entstehung eines oralen Plattenepithelkarzinoms ist ein mehrere Schritte umfassender Prozess, der eine Ansammlung von multiplen genetischen Veränderungen umfasst. Dabei spielen genetische Prädisposition sowie Umwelteinflüsse wie Tabak- und Alkoholkonsum, chronische Entzündungen und virale Infektionen eine gewichtige Rolle. All diese Faktoren können zu einer weiten Bandbreite von genetischen Mutationen führen, die molekularbiologisch erfasst werden können. Diese Genveränderungen beziehen sich in der Regel auf zwei große Gruppen von Genen: Onkogene und Tumorsuppressorgene. Diese werden durch Mutationen, Verlust der Heterozygotie, Deletionen oder epigenetische Modifikationen entweder inaktiviert oder überexprimiert. (Choi & Myers 2008; Pérez-Sayáns et al. 2009).

Dabei führen diese Veränderungen im Genom der Tumorzelle zu einer Fehlregulation krebserrelevanter Gene. Hier werden Proto-Onkogene in der Regel aktiviert und führen somit zu einem verstärkten Wachstum der Zelle. Tumorsuppressorgene, die in normalen Zellen das Zellwachstum kontrollieren, werden bei der Entstehung von Krebs hingegen inaktiviert und führen somit zu einem beschleunigten Wachstum der Tumorzelle. Wie bei anderen Tumorarten wird auch beim oralen Plattenepithelkarzinom angenommen, dass die Entwicklung der Tumorzelle über mehrere Schritte durch Anhäufung von Genexpressionsänderungen vorangetrieben wird, was zu einem Wachstumsvorteil und Überdauern der Zelle gegenüber den Nachbarzellen führt (Schmezer & Plass 2008).

1.2.2 Genetische Veränderungen beim OSCC

Bei der schrittweisen Entstehung eines OSCC wird angenommen, dass ein Verlust der Heterozygotie (LOH) an den Chromosomenabschnitten 9p21 und 3p14 zu den frühesten Ereignissen bei diesem Tumorprozess gehört, da schon bei einfachen Keratosen meist ein LOH dieser Gene nachgewiesen werden kann. Dabei entwickelt sich aus einer einfachen Keratose eine milde Dysplasie, was bei der Tumorentstehung einen besonders kritischen Schritt darstellt (Schwarz et al. 2008).

So liege bei 3p beim OSCC eine verringerte Anzahl an Amplifikationen vor (Hashimoto et al. 2000). Der für die tumorsupprimierende Wirkung verantwortliche spezifische Ort von 3p ist noch unbekannt, allerdings konnten mehrere Orte mit einem ausgeprägten Verlust von Allelen ausgemacht werden (Perez-Ordoñez et al. 2006). Dies sind die Orte 3p14, 3p21, 3p22, 3p24 und 3p26 (Garnis et al. 2003). Das Gen bei 3p14 wird zu den fragile histidine triade (FHIT) Genen gezählt (Otha et al. 1996), ein Tumorsuppressorgen, das den Apoptoseweg reguliert und induziert und das Zellwachstum bremst (Deng et al. 2007). Es sind allerdings noch weitere Studien notwendig, um die Rolle der Gene von 3p und ihre Signifikanz bei der Entstehung des oralen Plattenepithelkarzinoms genauer beurteilen zu können (Perez-Ordoñez et al. 2006).

Weiterhin ist bekannt, dass es beim Entstehen eines OSCC meist zu einer homozygoten Deletion auf dem Chromosom 9p21 kommt. Diese Region stellt eine kritische Stelle für einen Verlust der Heterozygotie bei verschiedenen Karzinomen dar (Argiris et al. 2008; Lydiatt et al. 1998). Diese komplexe Region kodiert unter anderem die Tumorsuppressorgene *CDKN2B* und *CDKN2A* (Worsham et al. 2006).

Der *CDKN2A* Lokus kontrolliert dabei die Retinoblastom (Rb)-Signaltransduktionskaskade, die im Zellzyklus den Übergang von der G₁- in die S-Phase reguliert, sowie auch den Signalweg von p53, der bei einer nicht mehr reparablen DNA-Schädigung einen Wachstumsstopp verursacht oder den Apoptoseweg der Zelle induziert (Xing et al. 1999).

Zusätzlich zu diesen häufigen Veränderungen in den Chromosomenabschnitten 9p21 und 3p sind weitere Veränderungen im Genom beim oralen Plattenepithelkarzinom beschrieben. So wird eine Steigerung der Amplifikation von 11q13 beobachtet (Argiris et al. 2008).

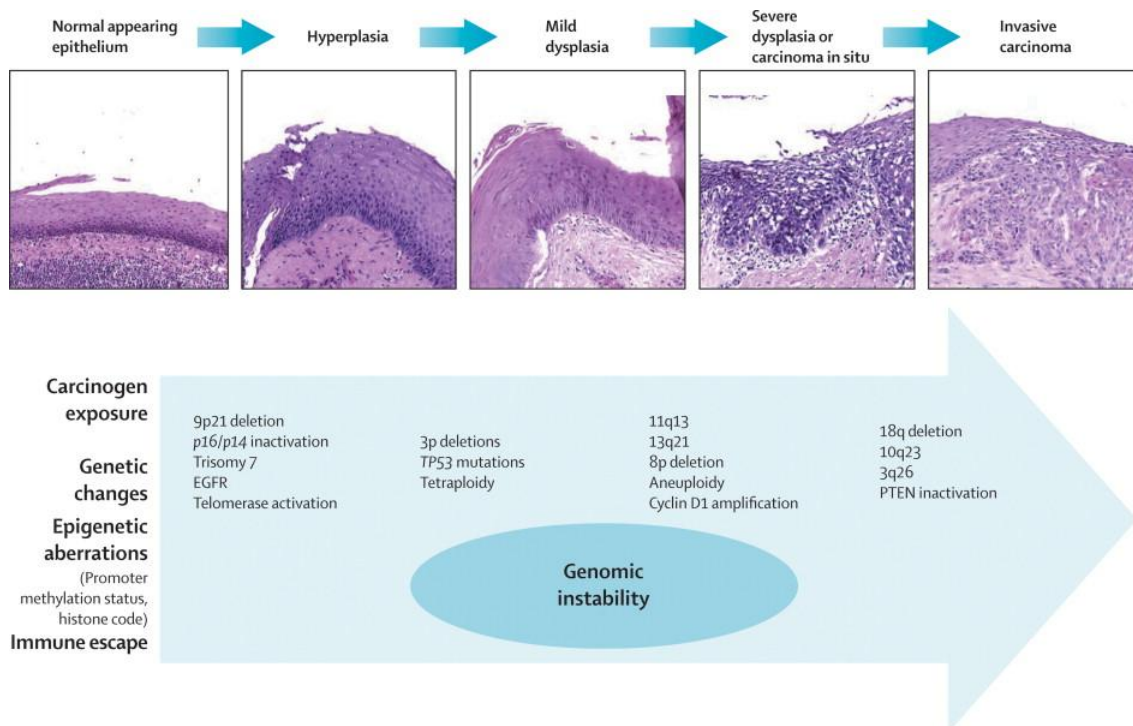
Eine vermehrte Amplifikation im Bereich von 11q13 wird mit einer gesteigerten Expression des Zellzyklusgens Cyclin D1 in Verbindung gebracht. Dies wird vor allem bei einer Metastasierung des Karzinoms beobachtet (Capaccio et al. 2000; Rodrigo et al. 2009). Cyclin D1 induziert eine Phosphorylierung des Retinoblastomproteins pRb, was die Aktivierung des

Transkriptionsfaktors E2F1 bedingt und so die Progression des Zellzyklus von der G₁- in die S-Phase katalysiert. Dieser Signalweg wird auch von CDK-Inhibitoren wie p16 reguliert. Eine vermehrte Amplifikation von 11q13 und damit von Cyclin D1, als auch eine Inaktivierung von p16 führt zu einem Übergang des Zellzyklus in die S-Phase. Bei vielen Tumorentitäten wird mindestens einer der Komponenten dieses Signalwegs mit einer hohen Frequenz inaktiviert (Okami et al. 1999). Dieses Gen könnte zusammen mit dem bereits erwähnten 9p21 zukünftig bei der Diagnostik eines oralen Plattenepithelkarzinoms eine Rolle spielen (Martin et al. 2008; Masuda et al. 2002).

Weiterhin existieren Mutationen am Genort 17p13, auf dem das Gen p53 lokalisiert ist. Dieses Gen spielt als Tumorsuppressor bei der Regulation des Zellzyklus eine wichtige Rolle. Die Funktion des kodierten Proteins ist es als Transkriptionsfaktor die Zelle in der G₁-Phase des Zellzyklus zu arretieren, DNA-Reparaturmechanismen zu aktivieren und bei einem nicht mehr zu behebenden DNA-Schaden den Apoptoseweg zu induzieren (Stiewe 2007). Ist das Protein p53 nicht mehr funktionsfähig oder fehlt es ganz, führt dies zu genomischer Instabilität. Es kommt zu einer weiteren Ansammlung von Mutationen und schlussendlich zu einer erhöhten Tumورprogression. In den meisten humanen Karzinomen treten Mutationen bei p53 auf. Dies führt dazu, dass das p53-Protein nicht mehr funktionell ist (Green & Kroemer). Dabei wird beim oralen Plattenepithelkarzinom davon ausgegangen, dass es erst bei fortgeschrittenem Tumورwachstum zu Mutationen am Gen p53 kommt, was auch mit der Transformation in ein invasives Karzinom einhergeht (Shahnavaz et al. 2000). Mutationen am Gen p53 gehen zudem mit einer gesteigerten Lymphknotenmetastasierung und einer allgemein schlechteren Überlebensprognose einher (Cabanillas et al. 2007; Ku et al. 2007).

Das in dieser Arbeit untersuchte Gen *HECA* befindet sich auf dem Locus 6q23-24 (Makino et al. 2001), ein Genloкус, der ebenfalls für die Anwesenheit von Tumorsuppressoren bekannt ist. Darauf soll bei der Beschreibung dieses Gens näher eingegangen werden.

Grafik 1 stellt die schrittweisen molekulargenetischen Veränderungen beim oralen Plattenepithelkarzinom dar.



Grafik 1: Dargestellt ist die histopathologische Progression bei der Entstehung eines HNSCC in Hämatoxylin-Eosinfärbung. Ebenso gezeigt sind die chronologisch auftretenden molekularen Veränderungen bei der Entstehung des Karzinoms (PTEN=phosphatase and tensin homologue). Grafik aus Argiris et al. 2008.

Eine weitere Veränderung bei der Entstehung eines oralen Plattenepithelkarzinoms bezieht sich auf die Gruppe der Wachstumsfaktoren, vor allem des Epidermalen Wachstumsfaktors EGF und seiner Familie. Diese nehmen eine zentrale Rolle bei der Einleitung der Mitose ein. Eine Überexpression ihres Rezeptors, dem EGFR ist in vielen Tumoren beobachtet worden. Wenn diese von Onkogenen kodierte Rezeptoren in Tumoren überexprimiert werden, stimulieren sie die Zellteilung (Harari 2004). Man geht davon aus, dass eine Überexpression von EGF oder seines Rezeptors mit einer schlechteren Prognose beim oralen Plattenepithelkarzinom einhergeht (Egloff & Grandis 2008; Cojocariu et al. 2009). Auch eine Phosphorylierung des Rezeptors soll die Prognose verschlechtern (Hama et al. 2009). In Kombination mit Chemotherapie oder Radiatio wird versucht, mit Hilfe von anti-EGFR-Antikörpern und EGFR-Tyrosinkinaseinhibitoren die Progression der Tumorerkrankung durch das Ausschalten dieses Signalwegs zu bekämpfen (Moon et al. 2010; Harari 2004). Beim HNSCC konnte bei Anwendung des EGFR-Inhibitors Cetuximab in Kombination mit einer Radiatio ein Anstieg der Überlebensrate und der Lebensqualität beobachtet werden. Allerdings liegen bis jetzt keine Studien vor, die der Anwendung von Cetuximab bessere Resultate gegenüber der von Cisplatin bescheinigen (Moon et al. 2010).

Die Fähigkeit von Tumoren, das umgebende Gewebe zu infiltrieren, stellt ein Hauptcharakteristikum ihrer Malignität dar. Dieser Prozess basiert auf der Fähigkeit des Tumors die extrazelluläre Matrix einschließlich der Basalmembran zu zerstören. Dieser Vorgang wird hauptsächlich von Matrixmetalloproteinasen (MMPs), einer Gruppe von zinkabhängigen Endopeptidasen vollzogen (Werner et al. 2002), die durch die Expression von TIMPs (tissue inhibitor of metalloproteinases) reguliert werden (Chaudhary et al. 2010). MMPs sind in der Lage die extrazelluläre Matrix, Wachstumsfaktoren und sich an der Zelloberfläche befindende Rezeptoren zu spalten. In Tumorgewebe werden sie viel stärker exprimiert als in normalem Gewebe (Rosenthal et al. 2006). Für die Stärke der Infiltration der Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs werden unter anderem die Matrixmetalloproteasen MMP -2, -9 und -13 sowie mit Abstrichen MMP-7 verantwortlich gemacht (Werner et al. 2002). Dagegen wirken die Inhibitoren TIMP-1 und TIMP-2 einer Metastasierung entgegen (Görögh et al. 2006; Chaudhary et al. 2010).

Zudem konnte gezeigt werden, dass eine Inhibierung der MMPs *in vitro* und in Mausmodellen zu einer verringerten Invasion und Metastasierung der Tumorzellen führte. In klinischen Untersuchungen konnte dieser Erfolg aber bislang nicht wiederholt werden (Rosenthal et al. 2006).

1.2.3 Humanes Papillomavirus

Wie auch beim Cervixkarzinom (Moody & Laimins 2010) wird die Entstehung eines OSCC in 20 bis 25% der Fälle durch das humane Papillomavirus verursacht. Der am meisten damit assoziierte Typus ist der Virus HPV 16 (Fakhri & Gillison 2006; Neufcoeur et al. 2009; St Guily et al. 2010; Yamakawa-Kakuta et al. 2009). Das HPV verursacht dabei die Entstehung eines Karzinoms durch die Expression der zwei viralen Onkoproteine E6 und E7. Diese degradieren und destabilisieren durch Ubiquitinierung hauptsächlich die beiden Tumorsuppressorproteine p53 und pRb. Die Folgen einer Inaktivierung dieser Proteine entsprechen den bereits dargestellten Reaktionswegen. Es sollen auch weitere Proteine wie Bak und p21(Cip1) betroffen sein, was die genetische Stabilität zusätzlich herabsetzt. Jedoch ist die alleinige Expression der Proteine E6 und E7 nicht ausreichend für eine zelluläre Transformation und es werden weitere genetische Veränderungen für eine maligne Progression der virusinduzierten Tumorerkrankung vermutet (Chung & Gillison 2009; Rampias et al. 2009).

1.3 Nichtinvasive Diagnosemöglichkeiten

1.3.1 Grundlagen

Gegenwärtig basiert die klinische Untersuchung von oralen Karzinomen und seiner präinvasiven Vorläuferläsionen auf der visuellen Betrachtung der Mundhöhle. Dieses Vorgehen ist auch meist sehr effektiv, allerdings wird die Effizienz der visuellen Untersuchung durch die Subjektivität des Untersuchers und das Auftreten einer Dysplasie oder eines frühen Plattenepithelkarzinoms in normal aussehender Schleimhaut gemindert. Folglich werden weitere Techniken benutzt, um zwischen benignen Abnormalitäten und malignen Veränderungen besser unterscheiden zu können. Hierzu werden Verfahren mit Toluidinblau, Chemolumineszenz, Autofluoreszenz im Gewebe sowie Bürstenbiopsien verwendet (Fedele 2009). Bei diesen Methoden wird von folgenden Werten für Sensitivität und Spezifität berichtet (Driemel, Kunkel et al. 2007):

Verfahren	Sensitivität	Spezifität
Toluidinblau	70 - 100 %	25 – 67 %
Photodynamische Diagnose	94 – 99 %	60 – 89 %
Autofluoreszenz	noch keine Wert vorhanden	
Orale Zytologie	80 %	95 – 100 %

Tabelle 1: Dargestellt sind die Werte für Sensitivität und Spezifität bei den entsprechenden Diagnoseverfahren.

1.3.2 Tumormarker

Zur Verbesserung der histopathologischen Diagnose wird nach weiteren Diagnostika geforscht. Gesucht werden unter anderem Tumormarker, die immunzytologisch nachgewiesen werden können. Beispielsweise treten nämlich in 30 % der Fälle Tumorrezidive auf, obwohl die Ränder histopathologisch als tumorfrei bezeichnet wurden. Die Einführung von zusätzlichen Markern soll nun die pathologische Diagnose zusätzlich verbessern, indem sie maligne Veränderungen nachweisen, die in gewöhnlichen histologischen Untersuchungen als normal klassifiziert wurden (Bilde et al. 2009). Es wird davon berichtet, dass die RNA von Tumoren eine spezifischere Analyse zulässt als die DNA (van Houten et al. 2002).

Auch der Nachweis von Proteinen weist Unterschiede zwischen gesunden und kranken Patienten auf. Die Proteomik könnte die Krebsforschung stark beschleunigen. Das Ziel liegt darin, neue Erkenntnisse in der frühen Diagnose und der Behandlung von Karzinomen zu

gewinnen (Hu & Wong 2007). Folgende Proteine werden beispielsweise mit Krebs in Verbindung gebracht, es sind aber viele weitere bekannt: Annexin A1, Hitzeschockprotein 27, Interleukin-1 Rezeptorantagonist, Serinproteaseinhibitor Clade B5, Stathmin 1 und Superoxid-Dismutase 2. Auf Laminin-5 und Tenascin wird im Folgenden näher eingegangen. Zu all diesen Proteinen sind aber noch weitere Erkenntnisse nötig (Koike et al. 2005; Lo et al. 2007).

Da auch für *HECA* eine Rolle als Tumormarker diskutiert wird, sollen nun einige Tumormarker, die mit einem oralen Karzinom in Verbindung gebracht werden, näher erläutert werden:

So wird beispielsweise auch Laminin-5 in der Technik der Bürstenbiopsie als immunzytochemischer Marker benutzt. Laminin-5 besitzt eine heterotrimere Struktur aus den Ketten $\alpha 3\beta 3\gamma 2$ und ist ein Schlüsselprotein des epithelialen Adhäsionskomplexes, bei dem unter anderem die orale Mukosa mit dem darunterliegenden Stroma verbunden wird (Kosmehl et al. 1999). Im Gegensatz zum kompletten Molekül agiert die isolierte $\gamma 2$ -Kette oder ihre proteolytischen Fragmente bei der Migration und Invasion von Zellen. Diese wandern beim Plattenepithelkarzinom durch die Basalmembran und befinden sich anschließend im Stroma der Invasionszone (Lyons & Jones 2007; Franz et al. 2007). Bei kolorektalen Neoplasien konnte bereits eine zytoplasmatische Färbung mit Laminin-5 festgestellt werden (Sordat et al. 2000). Auch in Neoplasien des Cervix Uteri gilt Laminin-5 oder die $\gamma 2$ Kette als Indikator für eine starke Neoplasie (Stoltzfus et al. 2004; Noel et al. 2005). Zusätzliches Miteinbeziehen der Immunzytochemie der $\gamma 2$ -Kette von Laminin-5 kann bei der Bürstenbiopsie die Werte für Sensitivität und Spezifität steigern (Driemel, Dahse et al. 2007).

Neben Laminin-5 werden in der extrazellulären Matrix von vielen Geweben auch Tenascine gefunden. Diese Glykoproteine unterstützen zum einen die Struktur des Gewebes, zum anderen regulieren sie auch das Schicksal von verschiedenen Zellen, die sich in dieser Matrix befinden. Sie werden vor allem bei Gewebsumbildungen in der Embryogenese und nach Verletzungen benötigt (Brellier et al. 2009). Die Invasion und Metastasierung von oralen Plattenepithelkarzinomen wird mit Veränderungen in der extrazellulären Matrix in Zusammenhang gebracht. Es konnte gezeigt werden, dass beim OSCC eine extrazelluläre Deposition sowohl von der großen ungespleißten Variante von Tenascin-C wie auch von Laminin-5 vorliegt. Weiterhin wird von einer sequenziellen Modulierung und Reorganisation der extrazellulären Matrix an der Grenzfläche von Tumor und Stroma ausgegangen, die in unterschiedlichen Stadien bei der Invasion des Karzinoms auftreten (Franz et al. 2006). Das Tenascinmolekül unterliegt dem alternativen Spleißen. Dabei wird in Tumorzellen vor allem die große ungespleißte Variante von Tenascin exprimiert, die sich in den übrigen Zellen nur

eingeschränkt findet (Hindermann et al. 1999). Bei Bürstenbiopsien konnten die Werte für Spezifität und Sensitivität mit Hilfe von Antikörpern gegen das hochmolekulare Spleißprodukt von Tenascin gegenüber den konventionellen Biopsien deutlich verbessert werden (Driemel, Dahse et al. 2007).

Zudem konnte in RT-qPCR-Analysen, bei denen die mRNA in Bürstenbiopsien gewonnen wurde, gezeigt werden, dass OSCCs durch die Expression ihrer extrazellulären Matrixproteine Laminin-5 und Tenascin-C detektiert werden können. Allerdings wird diese Möglichkeit des Nachweises durch die hohe Aktivität von RNAsen in der Mundhöhle eingeschränkt (Driemel, Kosmehl et al. 2007).

Ebenso werden die melanomassoziierten Antigene-A (MAGE-A), von denen zwölf Subtypen existieren, in einer Vielzahl von Tumoren exprimiert, allerdings nicht in gesundem Gewebe mit Ausnahme von embryonalem Nervengewebe und Testes. Ihre Detektion gelingt sehr spezifisch nur in Krebszellen (Ries et al. 2008). Bei Gewebeproben aus der Mundhöhle zeigte sich, dass in RT-qPCRs eine erhöhte Expression dieser Antigene nur bei Tumorproben vorlag, wobei es Unterschiede zwischen den einzelnen Subtypen gab. Allerdings verspricht die gleichzeitige Untersuchung mehrerer MAGE-A Antigene eine sensitivere Analyse für die diagnostische Evaluation eines OSCC (Ries et al. 2009). MAGE-A Expressionsanalysen könnten zukünftig eine sensitive Methode zur Diagnose von frühen Stadien des OSCC darstellen (Mollaoglu et al. 2008; Metzler et al. 2009). Weiterhin wird über eine Rolle von MAGE-A als immuntherapeutisches Ziel und als Impfstoff für ein orales Karzinom diskutiert (Ries et al. 2008).

Auch Zytokeratine können als Tumormarker verwendet werden. In mRNA aus oralen Bürstenbiopsien gewonnener mRNA kann mittels RT-qPCR eine Überexpression der Zytokeratine CK 17, CK19 und CK20 festgestellt werden. Am vielversprechendsten erscheint dabei CK 17. Die Detektion der mRNA der Zytokeratine ist in frühen Stadien und wenn noch keine Metastasierung stattgefunden hat, signifikant höher (Toyoshima et al. 2008, 2009).

Zudem sollen in Zukunft microRNAs als Biomarker für die Prognose eines Patienten dienen (Avissar et al. 2009). Beispielsweise können die microRNAs let-7d sowie 205 bereits als prognostische Marker benutzt werden (Childs et al. 2009). Einzelne microRNAs korrelieren mit dem jeweiligem Tumorstadium (Avissar et al. 2009). Es wird von zahlreichen microRNAs berichtet, die an der Pathogenese von Tumorerkrankungen beteiligt sind, allerdings sind noch weitere Forschungen auf diesem Gebiet notwendig.

Weiterhin wird von der Möglichkeit der Diagnose eines oralen Karzinoms durch Speichelproben berichtet. Dabei konnte im Speichel eine vermehrte Expression von bestimmten Genen

nachgewiesen werden. So können bei den Genen *IL1RN*, *MAL* und *MMP1* (Lallemant et al. 2009) und solCD44 (lösliche Form von CD 44) (Franzmann et al 2005 und 2007) Unterschiede in der Expression zwischen gesundem und krankem Gewebe festgestellt werden, wobei die Aussagekraft von *MMP1* am vielversprechendsten war. Es sind aber noch weitere Verbesserungen dieser nicht invasiven Technik erforderlich (Lallemant et al. 2009).

1.4 Entstehung verschiedener Proteinvarianten

1.4.1 Mechanismus des Spleißens

Die meisten für Proteine kodierenden Gene im menschlichen Genom setzen sich aus vielen Exons zusammen, die von Introns unterbrochen werden. Die Exons sind gewöhnlich relativ kurz mit einer Länge zwischen 50 und 250 Basenpaaren, wohingegen Introns viel länger sind und bis zu mehreren tausend Basenpaaren groß sein können. Exons enthalten die proteinkodierende Sequenz, während Introns als nicht-kodierend bezeichnet werden; ihre Funktion ist bis jetzt unklar. Jedoch wird vermutet, dass nicht-kodierende RNA-Sequenzen eine wichtige Rolle beim Chromatin Remodelling, der Transkriptionskontrolle und der posttranskriptionellen Prozessierung spielen (Mercer et al. 2009). Bei der Transkription des Gens werden die Exons und Introns in eine Prä-mRNA überführt. In einem als Spleißen bezeichneten Prozess werden anschließend die Introns aus dieser Prä-mRNA herausgeschnitten und es entsteht die messenger RNA (mRNA), die aus dem Zellkern ausgeschleußt wird und im Zytoplasma in ein Protein translatiert wird. Normalerweise kodieren die meisten Gene für mehrere Transkripte. Dies geschieht dadurch, dass die Exons verschieden zusammengesetzt werden, was zu einer unterschiedlichen mRNA führt. Folglich wird ein anderes Protein produziert. Diesen Vorgang bezeichnet man als alternatives Spleißen (van Alphen et al. 2009). Die große Mehrheit der Proteine unterliegt diesem Verfahren, das es einem Gen ermöglicht, für mehrere Proteine zu kodieren. So kann durch das Erstellen mehrerer Transkripte die Vielfältigkeit des Proteoms erweitert werden (Tazi et al. 2009).

Von großer Bedeutung sind dabei die Strukturelemente an den Übergängen von Exon zum Intron sowie im Intron selbst. Dies sind vom Intron aus gesehen eine 5'- und eine 3'-Spleißstelle wie auch eine spezifische Sequenz im Intron, die als *branch point sequence* (BPS) bezeichnet wird. Dadurch können durch diese bekannten Sequenzen auch bioinformatisch mutmaßliche Spleißstellen berechnet werden. Beim Spleißen werden durch mehrfache

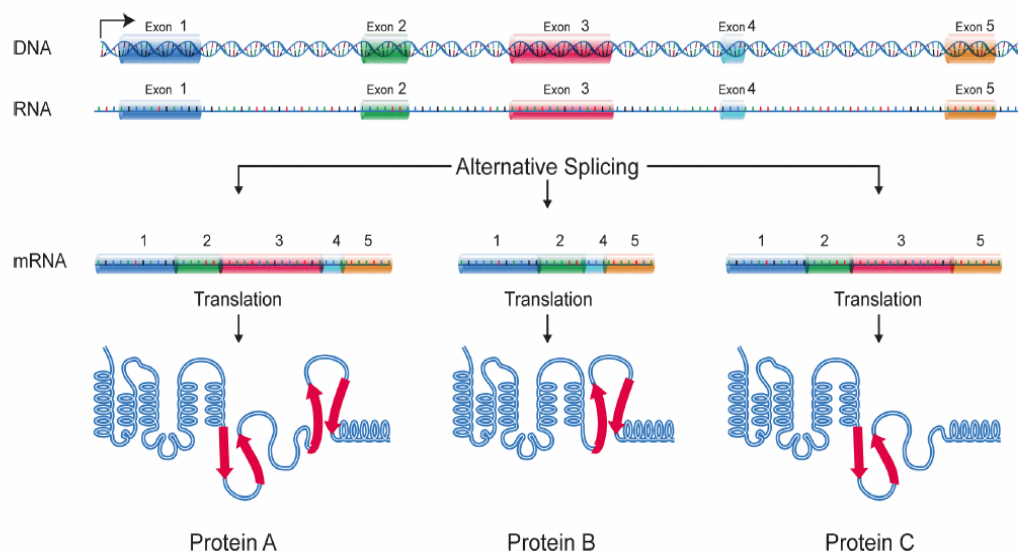
Umesterungen dann die Introns entfernt. Dies geschieht durch die fünf uridinreichen small nuclear RNAs (snRNAs) U1, U2, U4, U5 und U6, die sich mit bis zu 200 Proteinen zusammenlagern. Dieser Komplex wird Spleißosom genannt. Die snRNAs werden auch, weil sie in einem Komplex mit den Proteinen vorliegen, als Ribonukleoproteine snRNPs bezeichnet.

Der Vorgang des alternativen Spleißens ist noch nicht vollständig geklärt. Man geht aber davon aus, dass der Spleißvorgang nicht nur von Interaktionen der Basenpaare zwischen snRNPs und der Prä-mRNA abhängt, sondern auch von folgenden Faktoren beeinflusst wird:

- Kopplung des Spleißvorgangs an die Transkription
- Schnelligkeit der Reaktion
- Externe Stimuli wie Wachstumsfaktoren und oxidativer Stress
- Dreidimensionale Struktur der Prä-mRNA

(Wang & Burge 2008; House et al. 2008; Rino & Carmo-Fonseca 2009; van Alphen et al. 2009).

Ein Mechanismus zur Beeinflussung des Spleißvorgangs ist bekannt. Es wurden vier regulatorische Sequenzen identifiziert, die in den Introns und Exons lokalisiert sind. Es existieren davon zwei stimulierende, von denen sich die eine im Intron (ISE), die andere im Exon (ESE) befindet. Sie rekrutieren Spleißosomkomponenten oder Spleißfaktoren und katalysieren damit einen Spleißvorgang. Diese Sequenzen interagieren mit der Familie der heterogenen nukleären Ribonukleinproteine (hnRNP). Die inhibierenden Sequenzen befinden sich ebenfalls eine im Intron (ISS), die andere im Exon (ESS) und interagieren mit der Familie der Serin/Arginin- reichen (SR) Proteine. Sie blockieren Bindungsstellen an der Prä-mRNA (Shi et al. 2008; Wang & Burge 2008; van Alphen et al. 2009).



Grafik 2: Dargestellt ist der Vorgang des alternativen Spleißens. Durch die unterschiedliche Zusammensetzung der Exons entstehen verschiedene mRNAs, die folglich in unterschiedliche Proteine translatiert werden (http://www.genome.gov/Images/EdKit/bio2j_large.gif)

Alternatives Spleißen produziert aber nicht immer funktionsfähige Proteine. Es liegen Erkenntnisse vor, die besagen, dass eine beträchtliche Anzahl von alternativen Spleißergebnissen zu mRNA-Isoformen führt, die ein verfrühtes Stopkodon aufweisen. Diese Transkripte müssen wieder über den *nonsense-mediated mRNA decay* (NMD)-Signalweg abgebaut werden. Eine Erklärung dafür liegt in der Identifizierung von Spleißfehlern. Eine andere Möglichkeit wird darin vermutet, dass Zellen alternatives Spleißen und den NMD-Signalweg dazu benutzen, um überflüssige mRNA-Transkripte zu regulieren. Dieser Mechanismus konnte in einer weiten Bandbreite von Genen in unterschiedlichen Organismen gezeigt werden. Er wird auch häufig zur Autoregulation von Proteinen benutzt, die auf den Spleißprozess selbst Einfluss nehmen können (Lareau et al. 2007).

1.4.2 Alternatives Spleißen in Tumoren

Tumoren unterscheiden sich hinsichtlich der Ansammlung von alternativen Spleißformen von normalem Gewebe. Viele tumorassoziierte Spleißvarianten stammen von Genen ab, die in der Karzinogenese und in der Tumorprogression eine etablierte Rolle spielen. Dies erhöht wiederum die Wahrscheinlichkeit, dass alternative Spleißformen an der Pathogenese von Karzinomen teilhaben (Körner & Miller 2009). Es wurde gezeigt, dass diese in Tumoren exprimierten Spleißvarianten für hyperonkogene Proteine kodieren, die folglich oft mit einer schlechten Prognose korrelieren (Venables 2006).

Es werden aber auch die RNA-bindenden Proteine (RPBs) mit der Entstehung von Karzinomen assoziiert. Diese sind essentiell für den Metabolismus der RNA in Bezug auf Regulation des Spleißens, Transport, Abbau, Kontrolle und Translation. Ändert sich die Expression dieser Proteine oder ist ihr Funktionszustand eingeschränkt, kann dies zu krebsrelevanten Veränderungen des alternativen Spleißens führen (Kim et al. 2009; Lukong et al. 2008).

Spleißvarianten, die hauptsächlich in Tumoren gefunden werden, können als Diagnosemittel und als potentieller Ansatzpunkt für Medikamente verwendet werden. Zudem könnte das Verstehen des abweichenden Spleißprozesses wie auch eine detaillierte Untersuchung der Spleißvarianten zu neuen Erkenntnissen dieser malignen Transformationen beitragen (Brinkmann 2004; He et al. 2009).

Im Folgenden sollen einige alternative Spleißvarianten, die mit der Entstehung eines Tumors assoziiert werden, betrachtet werden:

Die Gene *MDM2* und *MDM4* (*murine double minute*) sind Onkogene, die als wichtige Regulatoren von verschiedenen Proteinen fungieren. Eine fundamentale Rolle fällt dabei der Regulation des Tumorsuppressors p53 zu (Toledo & Wahl 2006). Alternative Spleißformen von *MDM2* und *MDM4* werden mit vielen Krebsarten in Verbindung gebracht, aber auch eine Bestrahlung mit UV-Licht fördert ein alternatives Spleißen. Die Regulation der posttranskriptionalen Expression dieser und wahrscheinlich auch anderer Gene wird durch ein koordiniertes alternatives Spleißen gesteuert (Jeyaraj et al. 2009).

Survivin, ein Inhibitor des Apoptoseproteins (IAP) und ein Zellzyklusregulator, wurde in vielen humanen Karzinomen detektiert. Es konnten dabei fünf Spleißvarianten identifiziert werden. Bei Untersuchungen beim OSCC konnte festgestellt werden, dass drei Varianten signifikant vermehrt exprimiert werden. Es wird von einem signifikanten Einfluss der Survivin-Isoformen auf die Aggressivität und die Prognose von Tumoren ausgegangen (Maria et al. 2008).

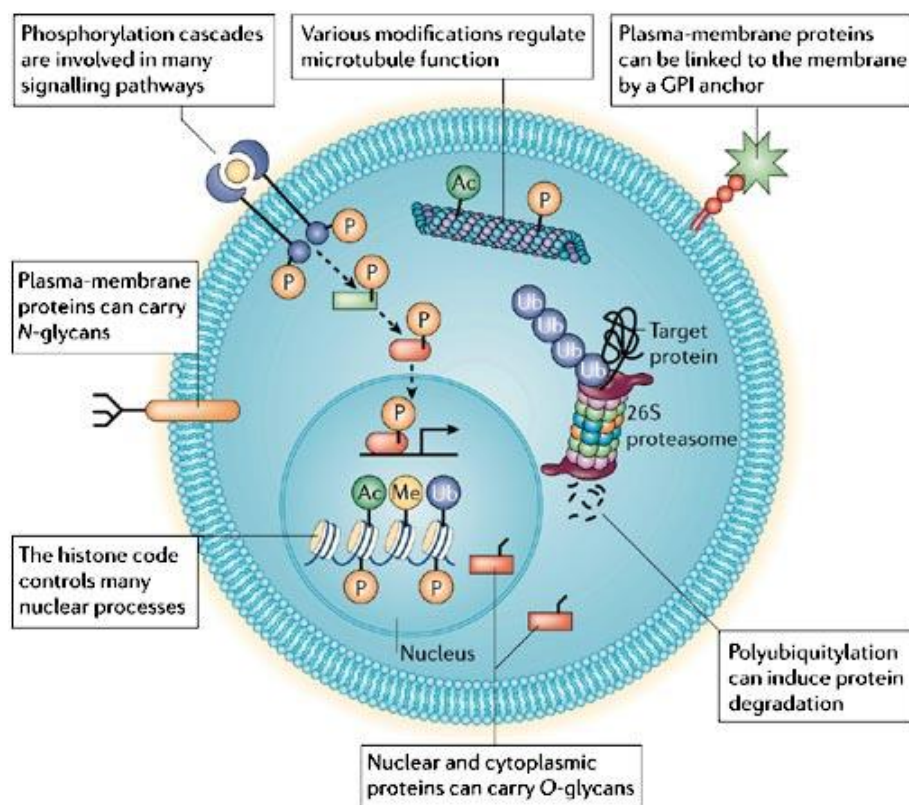
Das alternative Spleißen bei Tenascin-C wurde bereits erwähnt.

1.4.3 Posttranslationale Modifikationen

Posttranslationale Modifikationen (PTMs) von Proteinen spielen eine gewichtige Rolle in der Regulation des Zellstoffwechsels. PTMs sind enzymatische, kovalente Modifikationen von Proteinen, die typischerweise erst nach der Translation der mRNA auftreten. Diese

Modifikationen sind deshalb relevant, da sie die physikalischen und chemischen Eigenschaften der Proteine wie Aktivität, Lokalisation und Stabilität beeinflussen. Einige dieser PTMs können schnell entfernt und hinzugefügt werden und dienen so als reversibler Mechanismus für die Steuerung von Proteinfunktionen und von Zellsignalen (Farley & Link 2009).

So werden die biologischen Basisfunktionen der Proteine von den einzelnen Genen kodiert, wohingegen die Regulation von Proteinstruktur und Funktion generell von spezifischen PTMs wie beispielsweise Phosphorylierung, Glykosylierung und Acetylierung ausgeübt wird. Insgesamt existieren mehr als 200 Typen von PTMs, die in jedem Proteintypus vorkommen, von nukleären Transkriptionsfaktoren hin zu metabolischen Enzymen, Strukturproteinen und Plasmamembranrezeptoren. Dabei können PTMs verschiedene Funktionen ausführen. Beispielsweise kann durch proteolytische Spaltung ein Enzym aktiviert werden, Proteine können mit speziellen Modifizierungen für den Proteinabbau markiert werden (Polyubiquitinierung) oder Anhänge wie Glykosyl- und Phosphatreste führen zu einer Aktivierung, Interaktion oder Sekretion des Proteins (Jensen 2006).



Grafik 3: Dargestellt sind verschiedene Möglichkeiten einer posttranslationalen Modifikation von Proteinen (Jensen 2006)

1.4.4 Glykosylierung von Proteinen

Im Folgenden soll die posttranslationale Modifikation der Glykosylierung näher dargestellt werden, da in dieser Arbeit unter anderem eine Glykosylierung des HECA-Proteins nachgewiesen wird.

Die Glykosylierung stellt die häufigste posttranslationale Modifikation dar, bei der Oligosaccharidketten durch Glykosyltransferasen und Glykosidasen kovalent an das Ausgangsprotein gebunden werden. Die kombinierte Aktion dieser Enzyme führt zu einer Unzahl unterschiedlicher Glykanstrukturen. Dabei werden die Polysaccharide über N-glykosidische Bindungen an Asparaginreste gebunden oder über O-glykosidische Bindungen an Serin- oder Threoninresten. Glucosaminoglykane werden über Serinreste an Proteoglykane gebunden. Dabei können die Glykanstrukturen variieren zwischen hoch komplexen Strukturen und einfachen linearen Glykanen (Dube & Bertozzi 2005). N-Glykane spielen eine wichtige Rolle in der Zelladhäsion, weshalb bei auftretenden Modifikationen Auswirkungen auf die Invasion und Metastasierung von Krebszellen vermutet werden (Zhao YY et al. 2008). Veränderungen in der Glykosylierung von O-Glykanen treten beginnend von frühen Krebsstadien bis hin zu Stadien von Invasion und Metastasierung stets auf. Es liegen bis jetzt allerdings keine genauen Erkenntnisse über die Auswirkungen dieser anormalen Glykosylierungen vor (Reis et al. 2010).

Glykane üben ihre Funktion durch die Interaktion mit Proteinen aus, wobei sie dabei die Struktur der interagierenden Proteine verändern und folglich auch deren Funktion (Rek et al. 2009). Ein einzelnes Protein kann dabei in unterschiedlicher Weise glykosyliert werden, sodass verschiedene Varianten entstehen, deren Funktion sich wiederum unterscheidet.

Fehler im Glykosylierungsvorgang von Proteinen können zu einer reduzierten Aktivität, verringerter Halbwertszeit und ungewünschter immunogener Aktivität der Proteine führen (Brooks 2006). Die Analyse solcher Glykosylierungsformen gewinnt zunehmend an Interesse, da Veränderungen in der Glykosylierung bei bestimmten Erkrankungen wie Krebs auftreten.

Besonders O-glykosidische Glykane wie Glucosaminoglykane werden mit pathologischen Prozessen wie Entzündungen, Krebs und viralen Erkrankungen in Verbindung gebracht (Brooks 2009; Rek et al. 2009). Es ist bekannt, dass in Krebszellen Veränderungen der Glykosylierung von normalerweise auftretenden Glykanen vorliegen. Dies kann sowohl eine gesteigerte als auch eine verringerte Expression der betroffenen Glykane bedeuten. Diese Veränderungen beruhen meist auf einer Veränderung des Expressionslevels von Glykosyltransferasen im Golgiapparat, was wiederum vor allem zu Veränderungen im Gefüge von N- und O-Glykanen

führt. Weiterhin scheint zusätzlich zu Alterationen im Kernbereich der Proteine eine Veränderung terminaler Strukturen von Glykanen bedingt durch eine Überexpression von Glykosyltransferasen mit einer erhöhten Malignität im Tumorgewebe einherzugehen. Veränderungen solcher terminaler Epitope können bei Krebszellen im gesamten Körper beobachtet werden (Dube & Bertozzi 2005).

1.5 Das headcase-Gen

1.5.1 Grundlagen

In dieser Arbeit wird das Gen „HECA“ untersucht, ein humanes Homolog zum *Drosophila* headcase (*hdc*). Die bisher über dieses Gen publizierten Daten weisen darauf hin, dass *HECA* bei der Entstehung von Tumoren im menschlichen Organismus eine wichtige Rolle spielt. Headcase wurde zuerst in der Fruchtfliege identifiziert. Die bisherige Datenlage deutet in zwei Hauptrichtungen: Zum einen die Beteiligung an der Differenzierung imaginaler Strukturen und zum anderen am Aufbau des Tracheensystems.

1.5.2 headcase in Drosophila

Im Folgenden sollen die bislang bekannten Erkenntnisse über *headcase* dargestellt werden. Zuerst soll auf *headcase* im Modellorganismus *Drosophila melanogaster* eingegangen werden.

headcase wurde bei der Suche nach Genen identifiziert, welche möglicherweise von homeotischen Faktoren des Bithorax-Komplexes geregelt werden. Der Name *headcase* für dieses Gen entstand dadurch, dass Deletionsmutationen dieses DNA-Bereichs zu erheblichen Entwicklungsstörungen des Fliegenkopfes führten. Dies zeigte sich u.a. im Fehlen der Kopfkapsel oder in der Duplikation von Antennen bzw. Kopfkutikula. Zudem kann es durch die *headcase*-Deletion zu weiteren gravierenden Fehlbildung von ZNS, trachealem System, Muskulatur, Flügel und Beinen kommen.

Das sehr basische Headcase-Protein (pI 9,6) wird schon in der Embryonalphase von sich proliferierenden Zellen exprimiert; seine Expression endet mit den letzten embryonalen Zellteilungen und mit dem Eintritt in die Pupalphase. Die *headcase*-Expression reflektiert

demnach den Wiedereintritt imaginaler Zellen in die Mitose und kennzeichnet das Wachstum adulter Vorläufergewebe (Weaver & White 1995).

Des Weiteren stellte sich heraus, dass *headcase* für zwei unterschiedlich große Proteine kodiert, ein kleines mit 70 kDa und ein großes mit 125 kDa, die sich auch in ihrer Funktion unterscheiden, (Steneberg et al. 1999). Dies wird möglich durch das Vorhandensein eines internen UAA Stoppkodons auf dem *headcase*-Gen, welches bei der Translation überlesen werden kann. Dieses Überlesen läuft wahrscheinlich unabhängig von einem Stoppkodon und von bestimmten Suppressor tRNAs ab. Es konnte aber eine dem Stoppkodon nachgeschaltete 80 bp lange Sequenz nachgewiesen werden, die durch die Ausbildung einer Haarnadelstruktur die Suppression des Terminationssignals bewirken kann. Die genaueren Mechanismen dazu sind allerdings noch unbekannt. Dieser Vorgang stellt unter den eukaryotischen Genen einen neuartigen Mechanismus zur Translation eines funktionsfähigen Proteins dar (Steneberg & Samakovlis 2001).

Die Funktion dieses somit kodierten Proteins konnte bereits zuvor durch die Mutante Fusion-6 in *Drosophila* erkannt werden, welche allelisch zum bekannten *headcase*-Gen ist. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Mutante Fusion-6 bei der Ausbildung des Tracheensystems vermehrt unizelluläre Zweige bildet, die nicht wie im Wildtyp miteinander fusionieren. Dies stellte somit eine weitere Funktion von *headcase* dar: *headcase* ist am korrekten Aufbau des Tracheensystems beteiligt. Diese Funktion wird allerdings von *headcase* nur nach vorangegangener Aktivierung durch den Transkriptionsfaktor *escargot* ausgeübt. Dabei wird das Headcase-Protein in denjenigen Zellen exprimiert, die in den terminalen Gabelungen der Tracheenäste miteinander fusionieren. Dabei wirkt das Headcase-Protein inhibitorisch auf eine weitere Verzweigung ein.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass für diese unterdrückende Funktion hauptsächlich das große 125 kDa-Protein verantwortlich zu sein scheint. Der mutante Phänotyp von Fusion-6 konnte nämlich durch eine ektopische Expression des langen Headcase-Polypeptids gerettet werden. Beim kurzen Peptid war dies nicht der Fall; dieses besitzt nur eine geringe Aktivität, obwohl es 4x höher konzentriert vorkommt als das lange hdc-Peptid. Dies zeigt, dass das Überlesen des Stoppkodons im *headcase*-Gen überlebensnotwendig ist (Steneberg et al. 1999). Dabei erwies sich die supprimierende Aktivität des 125 kDa-Peptids als proportional zu seiner Konzentration. Daraus folgend könnte das Überlesen des Stoppkodons das Wachstum der Trachealzellen genauestens steuern (Steneberg & Samakovlis 2001).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass *headcase* mit dem Signalweg von Jak/Stat (Janus kinase/ Signal transducer and activator of transcription) interagiert, der in *Drosophila* mit

pleiotropen Effekten im Bezug auf viele Entwicklungsprozesse, wie beispielsweise Zellproliferation, Augenentwicklung oder Tracheenbildung, in Verbindung steht. Dabei konnte gezeigt werden, dass *headcase* supprimierend auf diesen Signalweg wirkt (Bach et al. 2003).

Ferner wurde nachgewiesen, dass die Gene *Buttonhead* (*btd*) und *Sp1* unter anderem das *headcase*-Gen aktivieren, dem sie folglich in der Signaltransduktionskaskade übergeordnet sind. *Btd* und *Sp1* sind u.a. beteiligt an der Organogenese von Kopf- und Beinstrukturen der Fruchtfliege (Estella et al. 2003).

1.5.3 HECA im menschlichen Organismus

Zu diesem gerade dargestellten Gen *headcase* (*hdc*) in *Drosophila* existiert auch ein humanes Homolog *HECA* (headcase homolog (*Drosophila*)). Es wurde bei der Suche nach Genen mit einem Verlust der Heterozygotie bei Pankreaszellkarzinomen auf dem langen Arm von Chromosom 6 (6q) identifiziert, mit der Annahme, dass sich auf diesem Chromosomenarm Tumorsuppressorgene befinden. Dabei handelt es sich um ein Gen, das auf der genauen Position 6q23-24 liegt und für eine mRNA mit der Größe von 5614 bp codiert. Davon kodiert eine 1632 bp-lange Sequenz für die Translation in ein folglich aus 543 Aminosäuren bestehendes Protein. Dabei stellte sich heraus, dass das translatierte Protein zu dem bereits erwähnten *Drosophila* Headcase-Protein eine Ähnlichkeit von 59% und eine Identität von 40% in 320 Aminosäuren aufweist. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die kodierende Region von *HECA* aus vier Exons und drei Introns besteht (Makino et al. 2001).

Zudem konnte gezeigt werden, dass *HECA* in allen Geweben auf einer basalen Ebene exprimiert wird, wobei sich die stärkste Expression in Milz, Prostata, Thymus und peripheren Blutleukozyten darstellte. Weiterhin liegt sowohl beim Pankreaszellkarzinom als auch beim Nierenzellkarzinom eine verringerte Expression dieses *HECA*-Gens vor. So wurde für *HECA* eine Rolle als Tumorsuppressor bei diesen Karzinomen vermutet (Makino et al. 2001; Chien et al. 2006).

Auch beim Kolonkarzinom variiert die Expression von *HECA*. Dabei zeigte sich, dass *HECA* beim Kolonkarzinom im Gegensatz zu gesunden Probanden stärker exprimiert wird. Zudem hängt die Expression vom Stadium der Erkrankung ab. In frühen Stadien wird *HECA* viel stärker exprimiert als in Späteren. Diese Ergebnisse wiederholten sich auch bei der Untersuchung von Blutproben. Folglich könnte *HECA* nach weiteren Untersuchungen als Tumormarker für das Erkennen eines

Kolonkarzinoms im frühen Stadium anhand des Faeces etabliert werden (Chien et al. 2006).

In dieser Arbeit soll die Rolle von *HECA* bei der Entstehung von Karzinomen im Kopfhalsbereich näher untersucht werden. Dazu liegen von Dowejko et al. (2009) bereits richtungsweisende Ergebnisse vor:

In immunhistologischen Untersuchungen an Gewebeschnitten von gesundem Plattenepithel der Mundhöhle wurde die Expression des *HECA*-Proteins sowohl in den Basalzellen als auch in den darüber liegenden Epithelschichten nachgewiesen. Im Vergleich dazu zeigten Plattenepithelkarzinome eine reduzierte *HECA*-Expression, welche in den Basalzellen völlig fehlte.

Weiterhin korreliert die *HECA*-Expression von mRNA und Protein wie beim Kolonkarzinom mit dem Differenzierungsgrad des Karzinoms. Dabei kam es bei entdifferenzierten OSCC-Zelllinien zu einer geringeren mRNA-Expression als bei noch differenzierungsfähigen.

Da in *Drosophila* das headcase-Protein mit Cyclin K (Stanyon et al. 2004) und dem Mitose-Checkpoint Protein Bub1-like (Giot et al. 2003) interagiert, wurde der Einfluss von *HECA* auf den Zellzyklus untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die *HECA*-Expression von Zellen, die sich in der S-Phase befanden, signifikant höher war als von denjenigen, die in der G₀/G₁-Phase arretiert waren. Dies stellt dar, dass *HECA* vor allem in mitotisch aktiven Zellen von Bedeutung ist.

In der Tat zeigte eine Proliferationsanalyse, dass *HECA*-überexprimierende OSCC-Zellen im Vergleich zur Kontrolle eine signifikant verlängerte Verdopplungszeit (bis zu 45 %) und ca. 30 % weniger mitotisch aktive Zellen aufwiesen.

Mittels Durchflusszytometrie wurde gezeigt, dass *HECA*-überexprimierende OSCC-Zellen bevorzugt in der G₂/M-Phase des Zellzyklus arretierten.

Basierend auf diesen Daten wird *HECA* als ein neuer Tumorsuppressor von Kopf- und Halstumorzellen diskutiert.

Interessanterweise ist das *HECA*-Gen bei 6q23-24 auf dem Chromosom lokalisiert, welches eine bekannte LOH-Region bzw. einen Ort gehäufte homozygoter Deletionen verschiedener Tumorsuppressorgene in unterschiedlichen Krebsarten darstellt, inklusive Kopf- und Halstumoren (Smith et al. 2006; Lemata et al. 2006; Ross et al. 2007).

Im Pankreastumor korreliert das Auftreten von LOHs bei 6q23-24 mit der malignen Progression (Speel et al. 2001; Barghorn et al. 2001). Auch in Speicheldrüsenkarzinomen (Stallmach et al. 2002) und Medulloblastomen (Hui et al. 2005) wurde 6q23 als ein wichtiger Tumorsuppressorloкус identifiziert. In Gliomen wurde ferner das *HECA*-Gen mit einer LOH-

Region bei 6q23-q26 assoziiert (Wong et al. 2006).

1.5.4 Molekulargenetische Grundlagen zu HECA

Wie oben erwähnt ist das *HECA-Gen* bei 6q23-24 auf dem Chromosom lokalisiert und umfasst eine Länge von 5614 bp (Makino et al. 2001). Diese Nukleotide werden in eine mRNA transskribiert, wobei die für das HECA-Volllängeprotein kodierende Sequenz 1632 Nukleotide beträgt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/CCDS/CcdsBrowse.cgi?REQUEST=GV&DATA=5591>). Insgesamt besteht die mRNA aus vier Exonen. Die nicht kodierenden und untranslatierten Bereiche befinden sich am 5'-Beginn von Exon 1 sowie am 3'-Ende von Exon 4.

Von unterschiedlichen Datenbanken (EC-Gene, UCSC, Swiss Institute of Bioinformatics (SIBI), Ace-View) wird von der Existenz verschiedener bioinformatisch errechneter Spleißvarianten berichtet. Dabei handelt es sich zum einen um die von SIBI angegebene Variante, die in dieser Arbeit im Folgenden als Spleißvariante I bezeichnet wird. Dieses Transkript unterscheidet sich von der bereits bekannten Variante dadurch, dass nach dem Spleißvorgang von Exon 4 nur der Anfangsbereich übrig bleibt (**Grafik 4**).

Von EC Gene wird eine weitere Variante angegeben. Dabei besteht das mRNA-Transkript vereinfacht dargestellt nur aus den Exonen 2 und 3. Hier beginnt das Transkript in Exon 2 allerdings erst ab dem 80. Nukleotid und setzt sich in Exon 3 um 68 Nukleotide über das Ende von Exon 3 der von NCBI angegebenen Variante hin fort. Dieses Transkript, das aus 1175 Nukleotiden besteht, wird in dieser Arbeit als Spleißvariante II bezeichnet (<http://genome.ewha.ac.kr/ECgene/>). Es könnte durchaus die Möglichkeit bestehen, dass diese beiden bioinformatisch errechneten Spleißvarianten I und II dieselbe *in vivo* vorhandene mRNA beschreiben.

Weiterhin wird von Ace View ein Transkript angegeben, das von einer kodierenden Sequenz von 1252 bp ausgeht. Diese Variante ist mit der von EC Gene angegebenen Spleißvariante II nahezu identisch. Im Unterschied dazu beginnt das Transkript in Exon 2 vom 5'-Ende gesehen bereits 80 Basen zuvor (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Acembly/av.cgi?exdb=AceView&db=36a&term=HECA&submit=Go>).

HECA genomische DNA



HECA mRNA (NCBI)



HECA mRNA Spleißvariante I (SIBI)



HECA mRNA Spleißvariante II (EC Gene)



Grafik 4: Dargestellt ist die genomische DNA des HECA-Gens, bestehend aus den vier Exonen, in Klammern ist jeweils die Nukleotidanzahl angegeben. Zudem ist die von NCBI publizierte HECA-Volllänge-mRNA dargestellt mit ihrem untranslatierten Bereich (UTR). Auch die Spleißvarianten I und II sind grafisch dargestellt; man beachte dabei vor allem die unterschiedliche Nukleotidanzahl in Exon 3.

Werden diese mRNA-Transkripte nun an den Ribosomen translatiert, entstehen unterschiedlich große HECA-Proteinvarianten. Von den einzelnen Datenbanken wurden die bei der Translation entstehenden Proteine errechnet. Bei der Translation der von NCBI angegebenen mRNA entsteht das HECA-Volllängeprotein mit einem Molekulargewicht von 58,8 kDa, das sich aus 543 Aminosäuren zusammensetzt (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/CCDS/CcidsBrowse.cgi?REQUEST=GV&DATA=5591>). Wird die Spleißvariante II in ein Protein überführt, entsteht ein aus 379 Aminosäuren bestehendes Protein mit einem Molekulargewicht von 42,73 kDa (<http://genome.ewha.ac.kr/ECgene/>). Bei der von Ace View angegebenen Variante wird ein Peptid mit einem Molekulargewicht von 46,8 kDa und 416 Aminosäuren produziert (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Acembly/av.cgi?exdb=AceView&db=36a&term=HECA&submit=Go>).

Für die von SIBI angegebene Spleißvariante I wurde keine Berechnung für das entstehende Protein durchgeführt.

Die gesamte Nukleotidsequenz der einzelnen mRNA-Transkripte sowie die Aminosäuresequenz der einzelnen Proteine befinden sich im Anhang. Dort sind auch die verwendeten PCR-Primer eingezeichnet.

1.6 Ziele der Arbeit

Ausgehend von der einleitend dargelegten Bedeutung als neuer Zellzyklus- und Differenzierungsregulator und putativer Tumorsuppressor sollte das *humane headcase (HECA)* und seine Isoformen in oralen Plattenepithelkarzinomen näher charakterisiert werden.

Im ersten Teil der Arbeit sollten zunächst die von Dowejko et al. (2009) dargestellten Expressionsunterschiede in den HECA-Proteinvarianten von OSCC Zellen und normalen oralen Keratinozyten (HOKs) mittels Immunoblotanalysen verifiziert werden. Anschließend sollte die subzelluläre Verteilung der HECA-Proteinvarianten sowie deren Abhängigkeit von der Zelldifferenzierung in OSCC Zelllinien und HOKs untersucht werden. Ein weiteres Ziel war es zu prüfen, ob die unterschiedlichen HECA-Peptide das Ergebnis posttranslationaler Modifikationen sind. Im zweiten Teil dieser Arbeit stand die PCR-Analyse der HECA-Varianten auf transkriptioneller Ebene im Fokus. Es sollte untersucht werden, ob die HECA-Peptidvarianten aufgrund der Existenz posttranskriptioneller Spleißformen exprimiert werden. Auf der Grundlage von bioinformatischen Datenbankeinträgen zu alternativen *HECA* mRNA-Varianten war beabsichtigt, die putativen *HECA* mRNA-Spleißformen in OSCC-Zellen und HOKs experimentell nachweisen. Anschließend sollten die Ergebnisse hinsichtlich der Funktion von *HECA* und seiner alternativen Varianten während der oralen Karzinogenese, als auch bezüglich einer potentiellen Verwendung als diskriminierender und prädiktiver OSCC-Tumormarker bewertet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Verwendete Materialien:

- 2-Propanol, 33539, Sigma, St. Louis, MO, USA
- 5x GoTaq Green Reaction Buffer, M7911, Promega, Madison, WI, USA
- Accutase, L11-007, PAA, Cölbe, D
- Amersham Hyperfilm™ ECL, 28906837, GE Healthcare Ltd., Little Chalfont, UK
- Amicon® Ultra-4, Centrifugal Filter Devices, PR02843, Millipore, Billerica, MA, USA
- Ammonium Persulfate (APS), 13375, Serva, Heidelberg, D
- Beta Actin antibody – Loading Control, ab8227-50, Abcam, Cambridge, UK
- BCA Solution, 71288, Novagen, USA
- complete Mini, 04693124001, Roche, Mannheim, D
- Cupric Sulfate 4%, 71287, Novagen, USA
- dNTP Set 100 mM, 28-4065-52, GE Healthcare Ltd, Little Chalfont, UK
- Donkey anti-goat IgG-HRP: sc-2020, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA
- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), P04-01550, Pan Biotech GmbH, Aidenbach, D
- Dulbecco's PBS (1x), H15-002, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
- Fetal Bovine Serum, 10270, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
- Glycin, 1.04201.1000, Merck, Darmstadt, D
- GoTaq DNA Polymerase, M3175, Promega, Madison, WI, USA
- HECA polyclonal antibody (A01), H00051696-A01, Abnova, Heidelberg, D
- HECA (C-19): sc-103543, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA
- HECA (K-18): sc-103545, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA
- Histon H3 Antibody, 2650, New England Biolabs, Frankfurt a. M., D
- Hypercassette™, RPN 13642, Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK
- Lambda Protein Phosphatase (λ-PPase), P0753S, New England Biolabs, Frankfurt a. M., D
- LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I, 03515869001, Roche, Mannheim, D
- L-Glutamin, K0283, Biochrom, Berlin, D
- MICROTEST™ Zellkulturplatte, 353075, Becton Dickinson Labware Europe, Meylan Cedex, F
- Natriumchlorid, 1.06404.1000, Merck, Darmstadt, D
- Oral Keratinocyte Growth Supplement, 2625, ScienCell, Carlsbad, CA, USA
- Oral Keratinocyte Medium, 2611, ScienCell, Carlsbad, CA, USA
- RIPA Buffer, R 0278, Sigma®, Saint Louis, MO, USA
- RIPA Buffer Set, 1920693, Roche, Mannheim, D
- RNeasy Mini Kit, 74104, Qiagen, Hilden, D
- Roti-Load Laemmli-Puffer, K929.1, Carl-Roth GmbH, Karlsruhe, D
- Roti®-Lumin, P0781, Carl-Roth GmbH, Karlsruhe, D
- Rotiphorese Gel 40, T802.1, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
- Pen/Strep Solution, C42010, PromoCell GmbH, Heidelberg, D
- Penicillin/Streptomycin Solution, 0503, ScienCell, Carlsbad, CA, USA
- Poly-L-Lysin 1 mg/ml, 0403, ScienCell, Carlsbad, CA, USA
- ProteoExtract® Subcellular Proteome Extraction Kit, 539790, Calbiochem, Darmstadt, D

- Protein Deglycosylation Mix, P6039S, New England Biolabs, , Frankfurt a. M., D
- Protein-LoBind Tubes, Eppendorf, Hamburg, D
- Quick-Load 100 bp DNA Ladder, N0467S, New England Biolabs, , Frankfurt a. M., D
- SeeBlue® Plus2 Prestained Standard (1x), LC5925, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
- SeaKem LE Agarose, 50004, Biozym, Hess. Oldendorf, D
- Sodium Dodecyl Sulfate Solution, 05030, Sigma, St. Louis, MO, USA
- Stabilized Goat Anti-Mouse IgG, 32430, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
- Stabilized Goat Anti-Rabbit IgG, 32460, Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
- Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit, 04379012001, Roche, Mannheim, D
- Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, 1.08382.1000, Merck, Darmstadt, D
- Trypsin-EDTA (0,05%/0,02%), L2143, Biochrom, Berlin, D
- Tween 20, P5927, Sigma, St. Louis, MO, USA
- Zellschaber, REF 353086, BD Falcon, Gräfeling-Locham, D
- Zellkulturflasche, 353108, Becton Dickinson Labware Europe, Le Pont de Claix, F

Verwendete Geräte:

- Biofuge fresco, 75005510, Heraeus, Hanau, D (Zentrifuge)
- BP 1200, 11609097, Sartorius, Göttingen, D (Waage)
- Genios, F129004, TECAN, Männedorf, CH (Messung Proteinkonzentration)
- HP Scanjet 5530, Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA (Scanner)
- Intas Geldokumentationssystem, Intas, Göttingen, D
- Mini-Protean Tetra Cell Elektrophoresesystem, Bio-Rad, München, D
- LC Carousel Centrifuge 2.0, 40427912, Roche, Mannheim, D (LC Zentrifuge)
- LightCycler 2.0, 01406510, Roche, Mannheim, D
- Peltier Thermal Cycler PTC-200, Bio-Rad, Hercules, CA, USA (PCR-Gerät)
- Standard Power Pack P25, 040-800, Biometra, Göttingen, D (Spannungsquelle Gelelektrophorese)
- TS-100 Thermo Shaker, 430803003, Kisker, Steinfurt, D
- Vortex-Genie 2, 2-90533, Scientific Industries, Bohemia, NY, USA

Rezepte für verwendete Pufferlösungen:

10x TBS-Puffer (1l):

- 24,2 g Tris Base
- 80 g NaCl
- mit HCl auf pH 7,6
- mit A.dest. auf 1l auffüllen

TBS-Waschpuffer:

- 1xTBS-Puffer
- 0,1 % Tween-20

10x TBE-Puffer (1l):

- 121,14 g Tris Base
- 51,33 g Borsäure
- 3,72 g EDTA
- mit A.dest auf 1l auffüllen

10x Elektrodenpuffer (1l):

- 30 g Tris Base
- 144 g Glycin
- 50 ml 20%iges SDS
- mit A. dest. auf 1l auffüllen

10x Transferpuffer (1l):

- 30 g Tris Base
- 142 g Glycin
- 100 ml Methanol
- mit A.dest. auf 1l auffüllen

1 M Tris (pH 7,6 und 6,8) (1l):

- 121,1 g Tris Base
- In 700 ml ddH₂O lösen
- Durch die Zugabe von HCl auf den gewünschten pH-Wert einstellen

2.2 Verwendete Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten Plattenepithelkarzinomzelllinien wurden von Prof. T. L. Whiteside (University of Pittsburgh Cancer Institute, Pittsburgh, PA) zur Verfügung gestellt. Ihr Ursprung ist jeweils ein Plattenepithelkarzinom in der Mundhöhle oder im Oropharynx (Heo et al.1989):

Name	Primärherd	TNM-Klassifikation	Differenzierungsgrad
PCI 1	Larynx	T2N0M0	moderately well
PCI 4	Zungengrund	T3N0M0	moderately well
PCI 9	BOT	T4N3M0	moderately
PCI 13	Retromolares Dreieck	T4N1M0	poorly
PCI 15	Sinus piriformis	T2N1M0	poorly
PCI 52	Aryepiglottische Falte	T2N0M0	moderately well
PCI 68	Zunge	T4N0M0	well

Tabelle 2: Dargestellt sind die in dieser Arbeit verwendeten Plattenepithelkarzinom-Zelllinien.

In Untersuchungen mit Cytokeratin-Markern konnte gezeigt werden, dass die Zelllinien PCI 1, PCI 13, PCI 68 und HOK (s.u.) gut differenziert sind, wohingegen dies bei den Zelllinien PCI 4 und PCI 52 nicht mehr der Fall ist (Bauer et al. 2008). Zu den Zelllinien PCI 9 und PCI 15 liegen dazu keine Ergebnisse vor.

Als gesunde Kontrollzellen wurden normale, humane, epitheliale Keratinozyten (NHEK) und humane orale Keratinozyten (HOK) verwendet. NHEK wurde von PromoCell, Heidelberg, bezogen und stammt von humanen adulten Keratinozyten ab. Die Zelllinie HOK kommt von

ScienCell (San Diego, CA) und wurde von humanen fetalen oralen Keratinozyten gewonnen. Beide Zellkulturen, NHEK und HOK, wurden nach Anweisung der Hersteller behandelt.

2.2.1 Kultur der Zelllinien

Von der Forschungsgruppe wurden tiefgefrorene Zellen gestellt. Diese wurden bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und anschließend in eine mit 37°C warmem Kulturmedium gefüllte Zellkulturschale gegeben.

Als Kulturmedium wurde für die Plattenepithelkarzinomzelllinien Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) von Gibco mit 1g/l Glukose, L-Glutamin und Pyruvat verwendet. Diesem Ausgangsmedium von 500 ml wurden 50 ml 10%iges fetales Kälberserum (FKS) zugegeben, das zuvor bei 56°C für 30 Minuten inaktiviert wurde. Zudem wurde die Lösung mit 2 mM L-Glutamin und einem 1%igen Penicillin/ Streptomycin-Mix (Promocell) versetzt.

Die Zellen wurden anschließend bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Ein Mediumwechsel wurde alle zwei Tage durchgeführt.

Erreichten die Zellen eine Konfluenzrate von 80-90%, wurden diese zur Aufrechterhaltung der Kultur gesplittet. Dabei wurde folgendermaßen vorgegangen:

- Absaugen des Kulturmediums
- zweimaliger Waschvorgang mit PBS (PAA)
- Zugabe von 1,5 ml Trypsin/EDTA-Lösung für ca. 5 min, bis sich die Zellen vollständig von der Kulturflasche gelöst haben
- anschließende Zugabe von 10 ml Medium und Überführung in ein Falcon-Röhrchen
- Zentrifugation für 5 min bei 1200 U/min
- Absaugen des Überstandes
- Resuspendierung der Zellen in 10 ml frischem Medium
- Weiterkultivierung der Zellen in einem beliebigen Mischungsverhältnis von beispielsweise 1:10 in einer neuen Zellkulturflasche

Für die Kultur der humanen oralen Keratinozyten HOK wurde analog vorgegangen, es ergeben sich allerdings folgende Unterschiede:

Als Medium wird das Oral Keratinocyte Medium von ScienCell verwendet, das durch die Zugabe von 5 ml Oral Keratinocyte Growth Supplement und 5 ml Penicillin/Streptomycin-Lösung von ScienCell nach Herstellerangaben vorbereitet wird.

Um eine ausreichende Adhäsion der Zellen an den Zellkulturflaschen zu erreichen, wurden diese mit Poly-L-Lysin beschichtet. Dabei wurden die Flaschen mit 10 ml sterilem Wasser und 15 µl Poly-L-Lysin (10mg/ml) für eine Stunde bei 37°C inkubiert und 2x mit sterilem Wasser gewaschen. Anschließend wurde analog vorgegangen. Beim Splitten wurde zum Ablösen der Zellen Accutase® verwendet, eine Enzymmischung, welche die Zellen weniger schädigt und somit eine höhere Ausbeute zur Folge hat.

2.2.2 Herstellung von Proteinlysaten

Hatten die gezüchteten Zellen eine gewünschte Konfluenz erreicht, wurden sie zur Erstellung von Proteinlysaten weiterverarbeitet.

2.2.2.1 Herstellung von Ganzzellproteinlysaten

- Kulturmedium verwerfen
- zweimaliger Waschvorgang der Zellen mit PBS
- Zugabe von 1,5 ml PBS in die Zellkulturflasche und anschließendes Abschaben der adhären Zellen mit einem sterilem Zellschaber (BD Falcon)
- Überführen der Zellsuspension in ein vorgekühltes Eppi
- Zentrifugation bei 3000 U/min für 5 min und Überstand dekantieren
- je nach Größe des gewonnenen Zellpellets resuspendieren in 50-200 µl RIPA-Lysispuffer (Sigma; Zellysepuffer enthält Proteaseinhibitor-Cocktail „Complete Mini“ (Roche))
- Lösung für 15 min bei 4°C schütteln
- Zentrifugation bei 13000 U/min für 10 min bei 4°C
- Überstand in Protein-LöBind Tubes (Eppendorf) überführen und Aufbewahrung bei 4°C

2.2.2.2 Herstellung von Proteinlysaten in subzellulären Fraktionen

Um eine evtl. unterschiedliche Expression des HECA-Proteins in den verschiedenen Kompartimenten der Zelle detektieren zu können, wurde aus den kultivierten Zellen mit dem ProteoExtract Subcellular Proteome-Kit (Calbiochem) das Proteom von folgenden

Zellkompartimenten extrahiert:

- Zytosol
- Membran und Organellen
- Nukleus
- Zytoskelett

Zudem boten die so gewonnenen Proteinlösungen den Vorteil, dass sie im Gegensatz zu den mit RIPA-Puffer behandelten Ganzzelllysaten keine weitere Zusatzstoffe enthalten, die eine spätere Behandlung der Proteine mit Enzymen behindern könnten.

Es wurde nach Herstellerangaben vorgegangen.

Da aufgrund der relativ großen Volumina die gewonnene Proteinkonzentration der einzelnen Proteinfraktionen relativ gering war, wurde die Konzentration durch die Verwendung von Amicon® Ultra-4 Centrifugal Filter Devices erhöht. Dabei wurden die Proteinlysate je nach Volumen zwischen 10 und 20 min bei 7500g zentrifugiert.

2.2.2.3 Messung der Proteinkonzentration

Bei den gewonnenen Proteinlösungen wurde anschließend die Proteinkonzentration mit Hilfe des BCA™ Protein Assay Kit (Novagen) bestimmt.

Dabei wurden in einer Doppelbestimmung jeweils 10 µl der zu untersuchenden Proben in einer Verdünnung von 1:10 in eine Küvette gegeben und mit jeweils 200 µl BCA-Reagenz versehen. Zusätzlich zu den untersuchenden Proben wurden zur Erstellung einer Standardkurve neun bekannte Proteinkonzentrationen in einer Doppelbestimmung gemessen.

Die so erstellten Reagenzlösungen wurden für 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde aufgrund der Färbereaktion die Proteinkonzentration bestimmt. Die photometrische Messung der Farbintensität erfolgte mit dem Genios-Gerät von Tecan bei einer Wellenlänge von 595 nm und der Software „Magellan“. Für das weitere Vorgehen wurde dabei der Mittelwert der beiden errechneten Proteinkonzentrationen verwendet.

2.2.2.4 Behandlung der Proteinlysate mit Enzymen zur Deglykosylierung

Zur Identifizierung posttranslationaler Glykosylierung des HECA-Proteins wurden die hergestellten Proteinlösungen mit einem enzymatischen Deglykosylierungsmix behandelt. Hierzu wurde der Protein Deglycosylation Mix von New England Biolabs verwendet, der die in Tabelle 3 aufgelisteten Enzyme enthält. Dieser Kit wurde nach Herstellerangaben verwendet.

Dabei wurde bei den subzellulären Fraktionen pro Reaktionsansatz eine Proteinmenge von 14,3 µg verwendet, bei den Ganzzellproteinlysaten eine Proteinmenge von 50 µg. Um Unterschiede zwischen deglykosylierten und unbehandelten Proteinlysaten feststellen zu können, wurde von jeder Probe jeweils eine Kontrollreaktion erstellt, die nicht mit dem Enzymmix behandelt wurde.

Als Beweis für die Funktionalität des Protein Deglycosylation Mix wurde eine Kontrollprobe mit Fetuin erstellt. Dieses Protein liegt in einem glykosylierten Zustand vor und kann mit diesem Enzymmix deglykosyliert werden.

Diese so behandelten Proteinlösungen wurden anschließend in Immunoblots analysiert.

Enzym	Ursprung	Funktion
Endo-α-N-Acetylgalactosaminidase oder O-Glykosidase	Enterococcus faecalis	Glykolyse von Disacchariden
PNGase F oder N-Glykosidase F	Flavobacterium meningosepticum	Amidase von Mannose, komplexen Oligosacchariden und Glykoproteinen
Neuraminidase oder Sialidase	Clostridium perfringens	Hydrolyse von N-Acetylneuraminsäureresten von Glykoproteinen und Oligosacchariden
β1-4 Galactosidase	Bacteroides fragilis	Exoglykosidase von D-Galaktopyranosylresten von Oligosacchariden
β-N-Acetylglucosaminidase	Xanthomonas manihotis	Exoglykosidase von β -N-Acetylglucosaminresten von Oligosacchariden

Tabelle 3: Dargestellt sind die für die Deglykosylierungsreaktion verwendeten Enzyme. Ursprung und Funktion sind ebenso aufgezeigt.

2.2.2.5 Behandlung der Proteinlysate mit λ -Phosphatase zur Dephosphorylierung

Zum Nachweis potentieller Phosphorylierung des HECA-Proteins wurden die hergestellten Proteinlösungen zur Dephosphorylierung mit der Lambda Protein Phosphatase von New England Biolabs behandelt. Dies ist eine Mn^{2+} -abhängige Proteinphosphatase, die eine Dephosphorylierung von phosphorylierten Serin-, Threonin- und Tyrosinresten katalysiert. Sie stammt aus dem Bakteriophagen Lambda und besitzt eine Enzymaktivität von 400,000 U/ml.

Es wurde nach folgender Versuchsanordnung vorgegangen:

Ein Reaktionsansatz enthielt:

- Proteinmenge von 40 μ g
- 10x λ -Phosphatase Reaction Buffer in einem Volumenverhältnis von 1:10
- 20 mM $MnCl_2$ in einem Volumenverhältnis 1:10
- λ -Phosphatase in einem Volumenverhältnis von 1:25 bzw. 1:50

Dieser Reaktionsansatz wurde für 30 min bzw. 60 min bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde gestoppt durch eine 5-minütige Hitzeinaktivierung bei 95°C.

Die so vorbereiteten Proteinlysate wurden anschließend in Immunoblots analysiert.

Die unterschiedlichen Angaben bei der Vorbereitung der Proteinlysate mit der λ -Phosphatase resultieren daraus, dass die Versuchsanordnung mehrfach modifiziert wurde, um die optimalen experimentellen Bedingungen herauszufinden.

2.2.2.6 Differenzierung von humanen oralen Keratinozyten

Um den Einfluss der Zelldifferenzierung auf die Expression des HECA-Proteins zu untersuchen, wurden HOK-Zellen mit einer Konfluenzrate von 90 % einem Differenzierungsprozess unterzogen. Dies erfolgte durch die Zugabe einer 1,5 mM $CaCl_2$ -Lösung für 24 Stunden in das Nährmedium. Anschließend wurden Proteinlysate hergestellt.

2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR) mit den entsprechenden Primerpaaren

Die Polymerasekettenreaktion ist ein Verfahren zur selektiven Amplifizierung bestimmter Nukleinsäuresequenzen. In dieser Arbeit wurde die PCR zum Nachweis von mRNA verwendet. Dazu ist eine vorherige Umsetzung der mRNA mittels reverser Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) notwendig. Dieses Vorgehen wird als Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) bezeichnet.

2.3.1 PCR- Bedingungen

Für die Durchführung einer PCR wird pro Probe folgender Reaktionsansatz erstellt:

Menge	Reagentium
36,5 µl	Wasser, PCR-Grade
10 µl	PCR-Reaktionspuffer (GoTaq, Promega)
1 µl	Desoxynukleotide dNTP (100mM Mix, Amersham)
0,5 µl	Forward-Primer
0,5 µl	Reverse-Primer
0,5 µl	Taq-Polymerase (GoTaq, Promega)

Tabelle 4: 50 µl Reaktionsansatz einer PCR

Zu diesem Ansatz, der im Gesamten 49 µl beträgt, wurde 1µl cDNA der jeweiligen Zelllinie gegeben.

Sobald alle Proben mit cDNA versetzt waren, wurde unverzüglich die PCR-Reaktion im Peltier Thermal Cycler PTC-200 von Bio-Rad nach folgendem Protokoll gestartet:

	Programmschritt	Temperatur	Dauer
1	Initiale Denaturierung	95°C	2 min
2	Denaturierung	95°C	30 sec
3	Primer- Annealing	50°C – 70°C	1 min
4	Elongation	72°C	1 min
5	Zyklenzahl	32x Go to Schritt 2	
6	Finale Elongation	72°C	5 min
7	Standby	4°C	For ever
8	Ende		

Tabelle 5: PCR-Protokoll

Um die für ein bestimmtes Primerpaar optimalen Versuchsbedingungen zu ermitteln, wurde eine Gradienten-PCR durchgeführt. Hierbei wurde bei zwölf Temperaturen zwischen 50°C und

70°C die bestmögliche Annealing- Temperatur ermittelt. Diese soll möglichst hoch sein, um unspezifische Bindungen der Primerpaare zu vermeiden.

2.3.2 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der DNA-Fragmente nach ihrer Größe wird ein 1,5 %iges Agarosegel hergestellt. Als Lösungsmittel wird TBE-Puffer verwendet. Pro Geltasche wurden 20 µl PCR-Reagenz eingesetzt. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte in der Elektrophoresekammer bei 100 V für 1 Stunde. Zur Visualisierung der PCR-Produkte wurde das Gel in einer Standard-Ethidiumbromid-Lösung (0,5 µg/ml) inkubiert. Ethidiumbromid ist ein fluoreszenter, nukleinsäure-interkalierender Farbstoff. Mit dem Geldokumentationssystem von Intas wurde unter UV-Licht eine digitale Aufnahme des Gels erstellt.

2.3.3 Verwendete Primer

Primer	Nukleotidsequenz	Annealing-Temperatur
HECA Ex 3-4 for	5'- GCACTATGTACACCTACGACATCC -3'	62°C
HECA Ex 3-4 rev	5'- TCCCACAGTGCTTACAGTTCA -3'	62°C
HECA U Ex 3a1 for	5'- GCACTATGTACACCTACGACATCC -3'	62°C
HECA U Ex 3a1 rev	5'- TGCTCCCTCAGTGTGTTCAG 3'	62°C
HECA T 2a for	5'- ACCTCTCCGAACTCCTCACTC -3'	55,5°C
HECA T 2a rev	5'-TCGGGAATCAAGACAGGG-3'	55,5°C
HECA T 2b for	5'- GCTGATCTTTAACCCACC 3'	55,5°C
HECA T 2b rev	5'- GCATACACTACACTGACGG -3'	55,5°C
HECA T 3 for	5'-ATCTGTATGCCGTGTGCG-3'	55,5°C
HECA T 3 rev	5'-CTGGAACATGGAGAGGCAG-3'	55,5°C
beta-Actin for	5'-CTACGTCGCCCTGGACTTCGAGC-3'	62°C
beta-Actin rev	5'- GATGGAGCCGCCGATCCACACGG-3'	62°C

Tabelle 6: Verwendete Primerpaare

Diese Primer wurden von TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH, Berlin, bezogen.

2.3.4 cDNA-Synthese

Um die isolierte mRNA in den nachfolgenden Versuchen als Reagenz für RT-PCR und RT-qPCR (= Reverse Transkriptase-quantitative PCR) verwenden zu können, muss diese mit dem Enzym

reverse Transkriptase in cDNA überführt werden. Dazu wurde das Transkriptor first strand cDNA Synthes Kite von Roche verwendet. Es wurde nach Herstellerangaben vorgegangen. Die RNA wurde von der Forschergruppe mittels des RNeasy Mini Kits (Qiagen) aus den zu untersuchenden Zelllinien isoliert. In der cDNA-Synthese wurden jeweils 3µl isolierter RNA eingesetzt.

2.4 Quantitative PCR (qPCR)

2.4.1 Theorie

Die quantitative PCR erlaubt nicht nur eine qualitative Begutachtung der amplifizierten DNA wie die konventionelle PCR, sondern sie gibt auch Rückschlüsse auf die Quantität der eingesetzten DNA-Menge. Dies ist möglich durch die ständige Messung der exponentiellen Produktakkumulation mittels Fluoreszenzlicht. Dabei ist die Stärke des Fluoreszenzsignals proportional zur Produktentwicklung. Durch anschließende mathematische Auswertung wird die Quantität der eingesetzten Probenmenge berechnet. Als Fluoreszenzfarbstoff zur DNA-Detektion wurde in dieser Arbeit SybrGreen verwendet.

Der Farbstoff SybrGreen bindet sequenzunspezifisch in der kleinen Furche der doppelsträngigen DNA. Durch seine Bindung steigt die Fluoreszenz stark an. Während des PCR-Vorgangs steigt die Menge der durch ein Primerpaar spezifisch markierten DNA-Sequenz an, wodurch folglich auch ein stärkeres Fluoreszenzsignal entsteht. SybrGreen ist allerdings mit dem Nachteil verbunden, dass es unspezifisch zum Beispiel auch an DNA/RNA-Artefakte und Primer-Dimere binden kann und somit das Ergebnis verfälscht. Deshalb muss nach einer mit SybrGreen durchgeführten qPCR auch eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt werden, um die Spezifität der Reaktion beurteilen zu können.

In einer Schmelzkurvenanalyse wird die Temperatur in kleinen Schritten von 50°C auf 95°C erhöht, wodurch die DNA langsam aufgeschmolzen wird. Bei einer fragmentspezifischen Temperatur löst sich der DNA-Doppelstrang und der Fluoreszenzfarbstoff wird frei, was zu einer verringerten Fluoreszenzdetektion führt. Unspezifische DNA-DNA-Bindungen können anhand ihres Schmelzverhaltens vom spezifischen PCR-Produkt unterschieden und so eine potentielle Kontamination identifiziert werden.

2.4.2 Praktisches Vorgehen

Wie bereits oben erwähnt, wurde zur Detektion der unterschiedlichen mRNA-Expression in den jeweiligen Zelllinien cDNA verwendet.

Ein SybrGreen-Reaktionsansatz enthielt folgende Reagenzien und wurde als Mastermix erstellt:

9 µl	Wasser, PCR- Grade
1 µl	20 µM forward- Primer
1 µl	20 µM reverse- Primer
4 µl	Lightcycler FastStart DNA Master ^{Plus} SybrGreen I
5 µl	1:5 verdünnte cDNA
20 µl	Gesamtvolumen

Tabelle 7: SybrGreen-qPCR-Reaktionsansatz.

Dieser Mastermix wurde nun in gekühlte 20 µl fassende LightcyclerTM-Glaskapillaren überführt. Nach einer Zentrifugation der Kapillaren bei 3600 U/min wurde die RT-qPCR im Lightcycler mit folgenden Einstellungen gestartet:

Reaktionsschritt		Temperatur	Dauer
Initiale Denaturierung		95°C	10 min
Amplifikation	Denaturierung	95°C	10 sec
	Annealing	Primerspezifisch zwischen 50°C und 70°C,	5 sec
	Elongation	72°C	20 sec
Schmelzkurve	Initiale Denaturierung	95°C	20 sec
	1. Teil	65°C	20 sec
	2. Teil	65°C bis 95°C, Slope 0,1°C/sec	
Zyklenanzahl: 45			

Tabelle 8: SybrGreen-qPCR-Reaktionsprotokoll

2.4.3 Analyse der mRNA-Expression mittels relativer Quantifizierung

Die qPCR-Analyse erfolgte gemäß einer relativen Quantifizierung mit internen Standards und Kalibrator als Versuchsstrategie.

Hierzu wurde im selben Versuchsansatz die Menge an Ziel-mRNA (HECA mRNA) relativ zur Menge einer Referenz-mRNA (beta-Actin mRNA, sog. „Housekeeping“-Gen) bestimmt und die

Verhältnisse errechnet. „Housekeeping“-Gene sind für die Aufrechterhaltung basaler Zellfunktionen wichtig und werden daher konstitutiv, auf einem meist konstanten Niveau exprimiert.

Zur Ermittlung der Primereffizienz wurden für jede untersuchte DNA-Sequenz externe Standardkurven mit Verdünnungsreihen einer Kalibrator mRNA aus PCI 13 über 4 log-Stufen erstellt, anhand derer die absoluten mRNA-Mengen von Ziel- und Referenzgen in den untersuchten Zelllinien bestimmt werden konnten.

Um die Expressionswerte zu validieren, wurden für jede untersuchte DNA-Sequenz jeweils 3 unabhängige Messungen in die Auswertung einbezogen und gemittelt.

Für die grafische Darstellung im Diagramm wurden die Werte auf die Expressionswerte von HOK-Zellen normiert.

2.5 Immunoblot

2.5.1 Prinzip des spezifischen Proteinnachweises aus einer Proteinlösung

In dieser Arbeit wird die Expression der unterschiedlichen HECA-Proteinvarianten mittels einer Kombination aus diskontinuierlicher SDS-PAGE und anschließendem Immunoblot (sog. „Westernblot“) untersucht. SDS-PAGE (engl. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, *Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese*) wird verwendet um Moleküle anhand ihrer Größe, Ladung oder ihres isoelektrischen Punktes von einander zu trennen. Das Gel stellt eine quervernetzte Polymermatrix dar, dessen Dichte durch Variation der Konzentration Acrylamidmonomere auf die Größe der zu untersuchenden Proteine eingestellt werden kann. Nach der Quervernetzungsreaktion wird das Gel fest und die Proteinproben (Zelllysate) können in kleine Geltaschen für die elektrophoretische Trennung eingefüllt werden. Dazu wird an das Gel eine elektrische Spannung angelegt und die Proteine beginnen im elektrischen Feld vom Minus zum Pluspol durch die Matrix zu wandern. Um diese Wanderung zu ermöglichen, müssen die Proteine vor dem Auftragen denaturiert und mittels des Detergens SDS negativ geladen werden. Dazu werden die Zelllysate nach Zugabe des SDS-haltigen Lämmli-Puffers (hier denaturierende Roti-Load®-Lösung 1, Roth) 5 min bei 95 °C erhitzt und auf das Gel aufgetragen. Die Menge an gebundenem SDS ist dabei proportional zur Proteingröße, sodass alle Proteine das gleiche Ladung zu Masse Verhältnis aufweisen. Die Proteine werden somit nur nach ihrer Größe aufgetrennt, unabhängig von ihrer Ladung. In eine

separate Geltasche wird ein Molekulargewichtsmarker mit aufgetragen, welcher Banden bekannter Größe produziert und die Identifizierung unbekannter Protein ermöglicht.

Das SDS-Gel ist diskontinuierlich aufgebaut, d.h. es besteht aus einem Sammelgel und einem Trenngel, die sich im Vernetzungsgrad und dem pH-Wert unterscheiden. Die Proben laufen zunächst in das Sammelgel, in welchem sie vor dem Eintritt in das Trenngel auf eine Front fokussiert werden, um bei der Proteinauftrennung scharfe Banden zu erzielen. Als Elektrolyt (Elektrodenpuffer) wird ein TRIS-Glycin-haltiger Puffer eingesetzt.

Nach dem Auftrennen werden die Proteine vom Gel auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran transferiert. Die extrem hydrophobe PVDF-Membran wird zuvor in Methanol getränkt, um sie für wässrige Lösungen zugänglich zu machen. Für den Proteintransfer wird ein elektrisches Feld senkrecht zum „Gel-Membran-Sandwich“ angelegt und die Proteine wandern vom Minus- zum Pluspol aus dem Gel auf die Membran, auf welcher sie durch hydrophobe Wechselwirkungen binden. Zur Prüfung der Transferrate kann die Gesamtheit der membrangebundenen Proteine unspezifisch mit Farbstoffen wie Coomassie oder Ponceau S visualisiert werden.

Für den spezifischen Nachweis werden poly- oder monoklonale Antikörper verwendet, welche spezifisch das Zielprotein erkennen. Dazu wird die Membran zunächst mit einer Lösung aus Rinderserumalbumin (BSA=*bovine serum albumin*) oder Milchpulver inkubiert („geblockt“), um unspezifische Antikörper-Bindestellen abzusättigen. Anschließend wird die Membran in der Blockierlösung mit dem primären Antikörper inkubiert, welcher spezifisch an das Zielprotein bindet. Daraufhin folgt die Inkubation (in der Blockierlösung) mit dem sekundären Antikörper, welcher den primären Antikörper erkennt. Typischerweise ist der sekundäre Antikörper kovalent an ein Enzym gebunden, welches unter Zugabe eines geeigneten Substrates ein chromogenes, fluoreszentes oder chemilumineszentes Signal freisetzt. In dieser Arbeit wird das Enzym Meerrettich-peroxidase (HRP=*horseradish peroxidase*) verwendet, welches unter Zugabe von Luminol (Roti-Lumin®, Roth) an der Bindestelle des sekundären Antikörpers ein chemilumineszentes Lichtsignal emittiert. Dieses Signal wird unter Verwendung von Röntgenfilmen sichtbar gemacht, wobei die Filme unterschiedlich lang auf der fixierten Membran belichtet werden, um die optimale Signalstärke zu ermitteln.

Nach einem Waschschrift kann die Membran erneut geblockt und für die Immundetektion eines anderen Proteins verwendet werden (z.B. beta-Actin).

2.5.2 Praktisches Vorgehen

Herstellung des Trenngels:

Es wurde ein 10 %iges Trenngel hergestellt, das für den Nachweis von Proteinen mit einem Molekulargewicht zwischen 20 kDa und 80 kDa ideal ist (Sambrook & Russell 2001).

Reagentium	Mengenangabe
Acrylamid (40%)	2,5 ml
1 M Tris pH 8,8	3,75 ml
Aqua dest.	3,6 ml
SDS 10%	100 µl
APS 10%	50 µl
TEMED	10 µl

Tabelle 9: Zusammensetzung der Reagenzien für ein 10 %iges Polyacrylamidtrenngel

Diese Gelflüssigkeit wurde in die Kammer des BIO-RAD-Elektrophoresesystems gefüllt und mit 1 ml Isopropanol beschichtet, um eine gleichmäßige Polymerisation am Übergang zum Sammelgel zu erreichen.

Herstellung des Sammelgels:

Reagentium	Mengenangabe
Aqua dest.	5,7 ml
Acrylamid (40%)	750 µl
0,5 M Tris pH 6,8	900 µl
SDS 10%	75 µl
APS 10%	50 µl
TEMED	7 µl

Tabelle 10: Zusammensetzung der Reagenzien für das Sammelgel

Anschließend wurde das bereits hergestellte Trenngel mit dem flüssigen Sammelgel beschichtet und sog. Plastikkämme eingesetzt, welche nach dem Aushärten wieder entfernt wurden und Geltaschen hinterließen.

Vorbereitung der Proteinlysate:

Pro Geltasche wurden wenn möglich 35 µg Protein eingesetzt. Die Proteinlösung wurde in einem Verhältnis von 1:4 mit Laemmli-Puffer verdünnt und anschließend für 5 min bei 95°C erwärmt.

SDS-PAGE:

- Marker: 10 µl SeeBlue Plus2 Prestained Standard
- Stromstärke: 80 mA
- Spannung: 160 V
- Dauer: ca. 2 h
- Kammer mit Elektrodenpuffer gefüllt

Blotting:

- PVDF-Membran 1 min in Methanol tränken, anschließend in Transferpuffer
- Filterpapiere in Transferpuffer tränken
- Gel mit Membran und beidseitig mit 2 Filterpapieren bedecken
- Blotten bei 140 mA für 90 min in der Blotbox des Bio-Rad-Elektrophoresesystems

Proteindetektion durch Antikörper:

- Inkubation der Membran in 3 oder 5%igem bovinem Serumalbumin (BSA) für 1 h
- Inkubation mit Primärantikörper über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler
- dreimaliger Waschvorgang für jeweils 3 min mit TBS-Waschpuffer
- Inkubation mit Sekundärantikörper für 1 h
- 3 x Waschen
- Inkubation für 1 Minute in Roti-Lumin-Lösung
- Überführen der Membran in eine Entwicklungskassette
- Filmentwicklung in der Dunkelkammer nach antikörperabhängigen Belichtungszeiten zwischen 1 und 15 min
- 3 x Waschen
- Blocken mit 3%igem BSA für 1 h
- 3 x Waschen
- Inkubation mit Primärantikörper beta-Aktin für 1 h
- 3 x Waschen
- Inkubation mit Sekundärantikörper für 1 h
- 3 x Waschen
- Inkubation der Membran in Roti-Lumin-Lösung für 1 Minute
- Filmentwicklung mit beta-Aktin Antikörper nach 3 Minuten Belichtungszeit

Verwendete Antikörper:

Name	Bemerkungen	Verwendete Konzentration
HECA (C-19): sc-103543 (Santa Cruz)	Ziege, polyklonal, in 5%igem BSA	1:800 oder 1:1000
HECA polyclonal antibody (A01): H00051696-A01 (Abnova)	Maus, polyklonal, in 3%igem BSA	1:1500
Beta Actin antibody – Loading Control: ab8227-50 (Abcam)	Hase, polyklonal, in 3 oder 5%igem BSA	1:10000
Donkey anti-goat IgG-HRP: sc-2020 (Santa Cruz)	Esel, in 5%igem BSA, Sek.-AK für HECA (C-19) (Santa Cruz)	1:6000
Stabilized Goat Anti-Mouse IgG: 32430 (Thermo Scientific)	Ziege, in 3%igem BSA, Sek.-AK für HECA polyclonal antibody (A01) (Abnova)	1:4000
Stabilized Goat Anti-Rabbit IgG: 32460 (Thermo Scientific)	Ziege, in 3 oder 5%igem BSA, Sek.-AK für Beta Actin antibody – Loading Control (Abcam)	1:4000
Histon H3 Antibody: 2650 (NEB)	Hase, polyklonal, in 3%igem BSA	1:1000

Tabelle 11: Darstellung der verwendeten Antikörper

2.5.3 Densitometrische Auswertung

Die Immunoblots wurden mit einer Auflösung von 300 dpi mit dem HP Scanjet 5530 von Hewlett Packard eingescannt. Anschließend wurden sie folgendermaßen mit Adobe Photoshop CS3 densitometrisch ausgewertet:

- Bild in Graustufen umkehren
- Bild invertieren
- Markieren der einzelnen Banden mit dem Polygon-Lasso-Werkzeug
- Für weitere Berechnungen wurde für jede Bande das Produkt aus Pixelanzahl und Tonmittelwert gebildet

Die densitometrische Auswertung erfolgte in dieser Arbeit exemplarisch. Für eine statistische Aussagekraft müsste der Mittelwert aus mindestens drei verschiedenen Messungen gebildet werden.

3 Ergebnisse

3.1 Analyse der Proteinexpression von HECA anhand von Immunoblots

3.1.1 Vergleich der Proteinexpression von humanen oralen Keratinozyten und verschiedenen Tumorzelllinien

Bei der Untersuchung der Proteinexpression in Zelllysaten von humanen oralen Keratinozyten (HOKs) und Tumorzelllinien mit dem polyklonalen HECA-Antikörper (HECA-AK) von Abnova wurden folgende Ergebnisse erzielt: eine Volllänge des HECA-Proteins von 59 kDa sowie eine kurze Proteinvariante von 40 kDa. Auffällig ist die vergleichsweise geringe Detektion der 59 kDa-Bande bei HOK. Weiterhin zeigt sich bei den Tumorzelllinien ein anderes Verhältnis von voller zu kurzer Proteinlänge. Vor allem bei PCI 52 und PCI 68 sowie mit Abstrichen bei PCI 1 liegt die lange Version des HECA-Proteins im Gegensatz zur kürzeren in einer höheren Konzentration vor. Bei PCI 4A und PCI 13 besteht ein annäherndes Gleichgewicht zwischen den beiden Varianten, wohingegen sich bei HOK das Verhältnis stark zugunsten der kurzen Variante verschiebt, was vor allem in Abbildung 1 sichtbar wird.

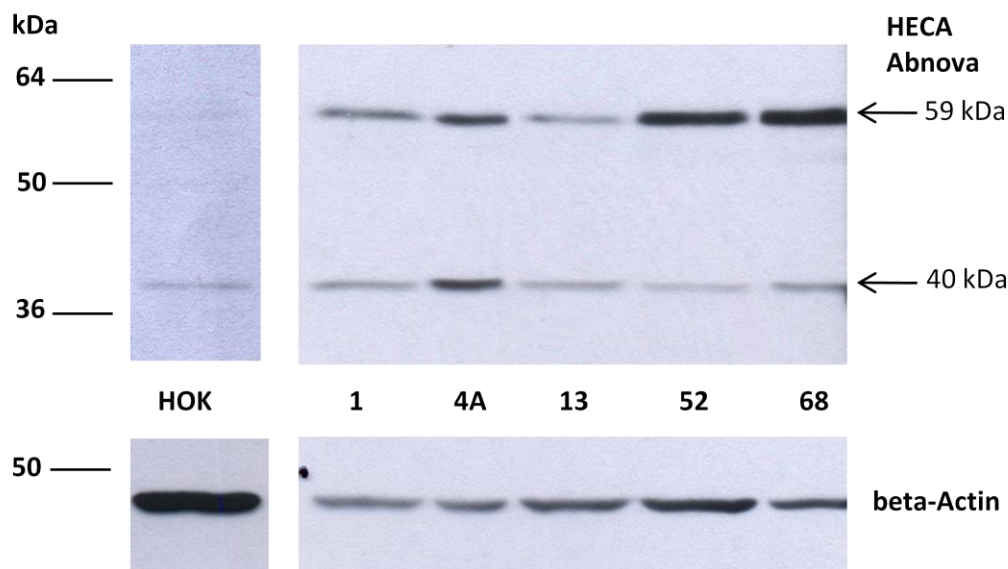


Abbildung 1: Immunoblot. Analyse („Westernblot“) von Proteinvarianten von HECA in Zelllysaten von HOKs und von verschiedenen Tumorzelllinien mit einer jeweiligen Proteinmenge von 35µg pro Spur. Als Antikörper wurde der polyklonale HECA-AK von Abnova (Verdünnung 1:1500) verwendet, als Referenzwert der Antikörper gegen das Housekeepingprotein beta-Actin.

Bei der Verwendung des polyklonalen Antikörpers von Santa Cruz ergeben sich folgende Ergebnisse: eine Volllänge des HECA-Proteins von 59 kDa sowie eine kurze Proteinvariante von

40 kDa. Zusätzlich existieren noch weitere Varianten, wobei v.a. die 47 kDa-Bande bei HOK zu beachten ist (**Abb. 2, Bande c**), die in den Tumorzelllinien fehlt. Zusätzlich wird bei PCI 4A eine weitere kurze Variante detektiert (**Abb. 2, Bande e**), die unter 3.1.4 noch näher erläutert wird. Bei PCI 68 tritt zudem eine weitere längere Variante bei 63 kDa auf (**Abb. 2, Bandef**). Auf die zusätzliche Bande bei PCI 52 im Bereich von 45 kDa wird ebenso im Folgenden näher eingegangen (**Abb. 2, Bande d**).

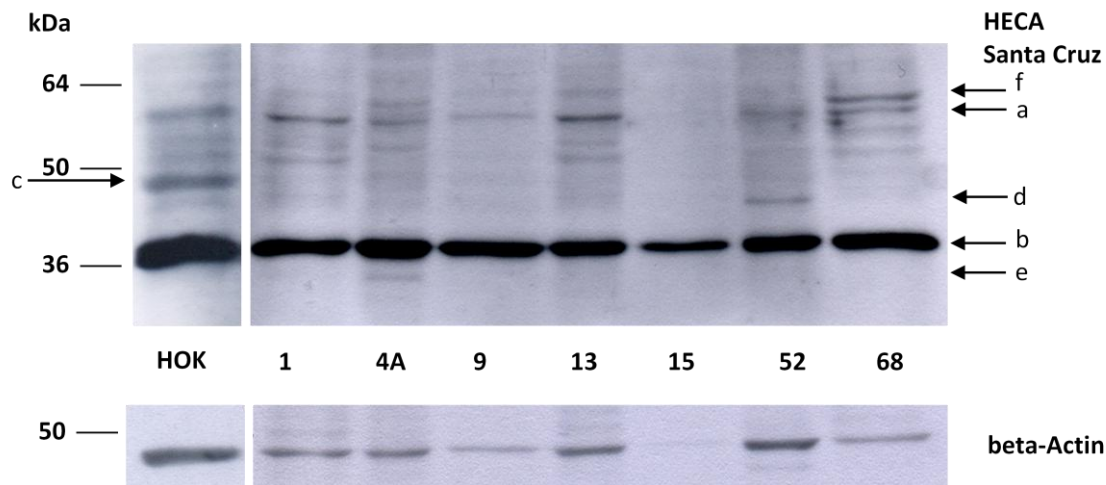


Abbildung 2: Immunoblot. Analyse („Westernblot“) von Proteinvarianten von HECA in Zelllysaten von HOKs und von verschiedenen Tumorzelllinien mit einer jeweiligen Proteinmenge von 35µg pro Spur; bei PCI 9 liegen nur 32µg, bei PCI 15 nur 15,8µg vor. Als Antikörper wurde der HECA-AK von Santa Cruz (Verdünnung 1:1000) verwendet, als Referenzwert der Antikörper gegen das Housekeepingprotein beta-Actin

3.1.2 Untersuchung der Expression der HECA-Proteinvarianten in den einzelnen subzellulären Fraktionen von humanen oralen Keratinozyten und Tumorzellen

Aus den jeweiligen Zellkulturen wurden Proteinlysate der einzelnen subzellulären Fraktionen hergestellt. Da sich die gewonnene Proteinkonzentration aus den einzelnen Fraktionen nicht einheitlich darstellte und diese per se geringer als in den Ganzzelllysaten war, wurde deshalb meist eine maximal mögliche Proteinmenge in den Versuchen eingesetzt, um eine entsprechende Reaktion mit dem Primärantikörper erreichen zu können. Weiterhin wurde hier nur der Antikörper von Santa Cruz verwendet, weil dieser bereits bei geringsten Proteinmengen detektiert.

Es konnte nachgewiesen werden, dass sich die Expression der HECA-Proteinvarianten in den einzelnen untersuchten Fraktionen unterscheidet.

Dabei ist im Zytosol die 40 kDa-Bande am stärksten ausgeprägt (**Abb. 3, 4, 5 und 6, Bande b**). Die 59 kDa-Bande ist im Gegensatz zu den anderen Fraktionen nur in sehr geringem Umfang vorhanden (**Abb. 3, 4, 5 und 6, Bande a**). Bei den Zelllinien PCI 1, PCI 52 und PCI 68 ist die Volllängebande zudem stärker ausgeprägt als bei HOK und der Zelllinie PCI 13. Weiterhin kann nur im Zytosol aller untersuchten Zelllinien außer PCI 52 (**Abb. 5**) eine Bande bei 33 kDa nachgewiesen werden (**Abb. 3, 4 und 6, Bande e**).

In der nukleären Fraktion zeigen sich folgende Ergebnisse: Die 40 kDa-Bande ist bei PCI 1, PCI 13 und PCI 52 schwächer ausgeprägt als im Zytosol. Bei HOK und PCI 68 unterscheidet sie sich davon allerdings nur marginal in ihrer Expressionsstärke (**Abb. 3, 4, 5 und 6, Bande b**). Die Proteinvolllänge ist im Nukleus stärker ausgeprägt als im Zytosol (**Abb. 3, 4, 5 und 6, Bande a**). Zudem existiert in der nukleären Fraktion eine geringfügig längere Proteinvariante von 63 kDa. Diese ist allerdings immer in einer geringeren Konzentration vorhanden (**Abb. 3, 4 und 6, Bande f**) und fehlt wiederum bei PCI 52 (**Abb. 5**).

Interessanterweise befindet sich im Zytoskelett hauptsächlich die lange Variante von 59 kDa des HECA-Proteins (**Abb. 3, 4, 5 und 6, Bande a**) wobei zusätzlich eine geringfügig kürzere Variante existiert, die sich bei HOK, PCI 1 und PCI 13 als Doppelbande zeigt, bei PCI 52 und PCI 68 aber als einzelne zu erkennen ist (**Abb. 5 und 6, Bande g**). Zudem ist in diesem Kompartiment die kurze Variante von 40 kDa mit Ausnahme von PCI 68 nur in einem sehr geringen Maß vorhanden. Weiterhin scheint die in 3.1.1 beschriebene Bande von 47 kDa (**Abb. 1, Bande c**) in HOK nur im Zytoskelett vorzukommen (**Abb. 3, Bande c**). Bei der Untersuchung der Tumorzelllinien als Ganzzelllysate konnte diese Bande dort nicht nachgewiesen werden. In der zytosolischen Fraktion kann sie aber auch in den Tumorproben detektiert werden, sie liegt aber in einer beträchtlich geringeren Konzentration als in den HOKs vor.

Im Kompartiment von Membran und Organellen existiert nur die kurze Version von 40 kDa (**Abb. 3, 4, 5 und 6, Bande b**). Es befinden sich hier keine weiteren Varianten. Zudem sind zwischen den einzelnen Zelllinien keine Unterschiede zu erkennen.

Der Nachweis, dass es sich bei den erstellten Proteinlysaten tatsächlich um die entsprechenden subzellulären Fraktionen handelt, wurde exemplarisch an PCI 68 durchgeführt. Dabei wurde im Zytosol das Zytoskelettprotein beta-Actin, vermutlich beta-Actinmonomere, nachgewiesen sowie im Zytoskelett beta-Actinfilamente. Im Nukleus war dies folglich nicht möglich. Die Kernfraktion wurde durch den Nachweis von Histonen bewiesen (Histon H3-AK), welche konstitutiv an DNA gebunden vorliegen. In den anderen Fraktionen fand sich hier keine Reaktion (**Abb. 6**).

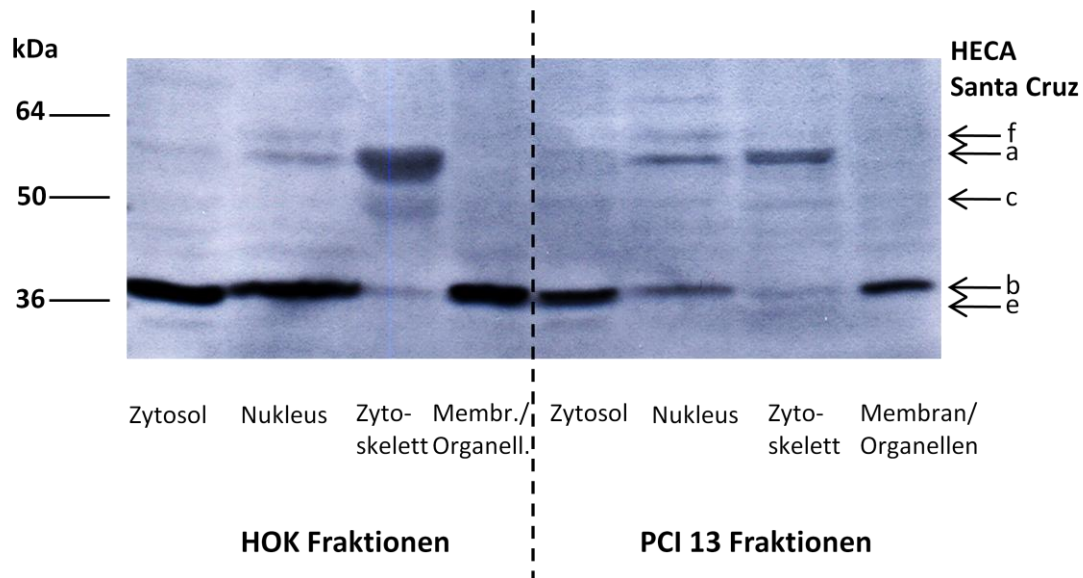


Abbildung 3: Subzelluläre Fraktionen von HOK und PCI 13 mit dem HECA-AK von Santa Cruz (Verdünnung 1:800). Bei den einzelnen Fraktionen wurde eine Proteinmenge von 18µg eingesetzt. Aufgrund einer zu geringen Ausbeute bei der Isolation einzelner Fraktionen konnten diese Proteinkonzentration bei folgenden Fraktionen nicht erreicht werden: HOK Nukleus 17,0µg, HOK Zytoskelett 10,0µg, PCI 13 Nukleus 10,9µg und PCI 13 Zytoskelett 8,7µg.

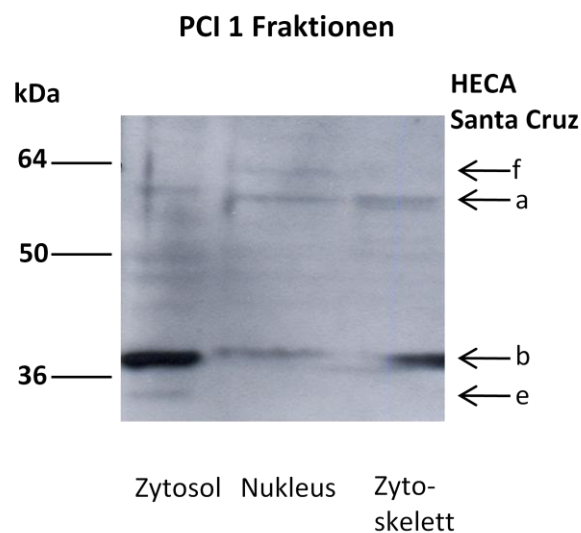


Abbildung 4: Subzelluläre Fraktionen von PCI 1 mit dem HECA-AK von Santa Cruz (Verdünnung 1:800). Aufgrund einer zu geringen Ausbeute bei der Isolation der einzelnen Fraktionen wurde jeweils die maximal mögliche Proteinmenge aufgetragen: Fraktion Zytosol 10,6µg, Nukleus 11,0µg und Zytoskelett 6,5µg. Die halbe Bande in der Fraktion Zytoskelett (**6b**) ist auf eine Verunreinigung durch einen benachbarten Versuch zurückzuführen.

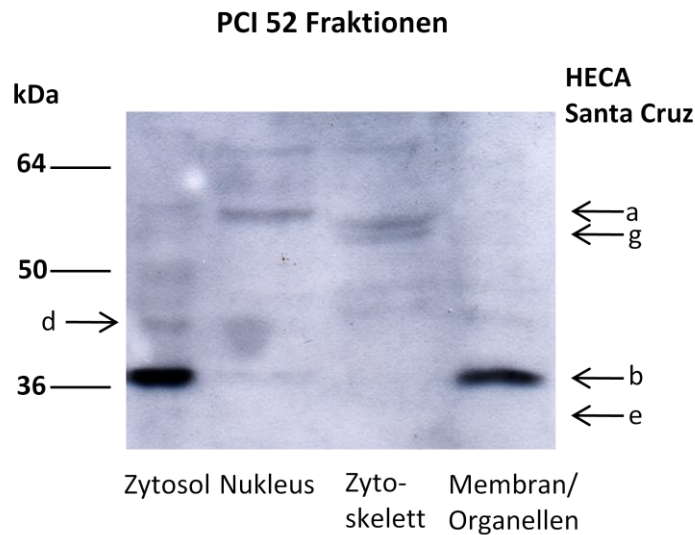


Abbildung 5: Subzelluläre Fraktionen von PCI 52 mit dem HECA-AK von Santa Cruz (Verdünnung 1:800). Aufgrund einer zu geringen Ausbeute bei der Isolation der einzelnen Fraktionen wurde jeweils die maximal mögliche Proteinmenge aufgetragen: Fraktion Zytosol 8,48µg, Nukleus 8,48µg, Zyto-skelett 2,00 µg, Membran und Organellen 6,44µg.

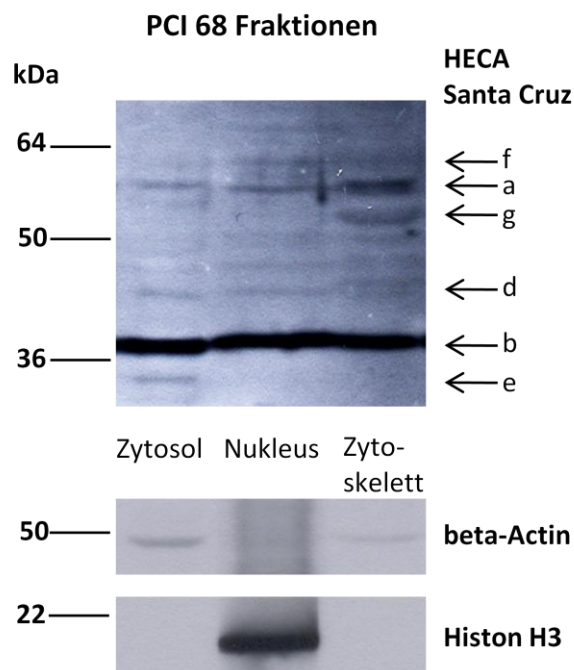
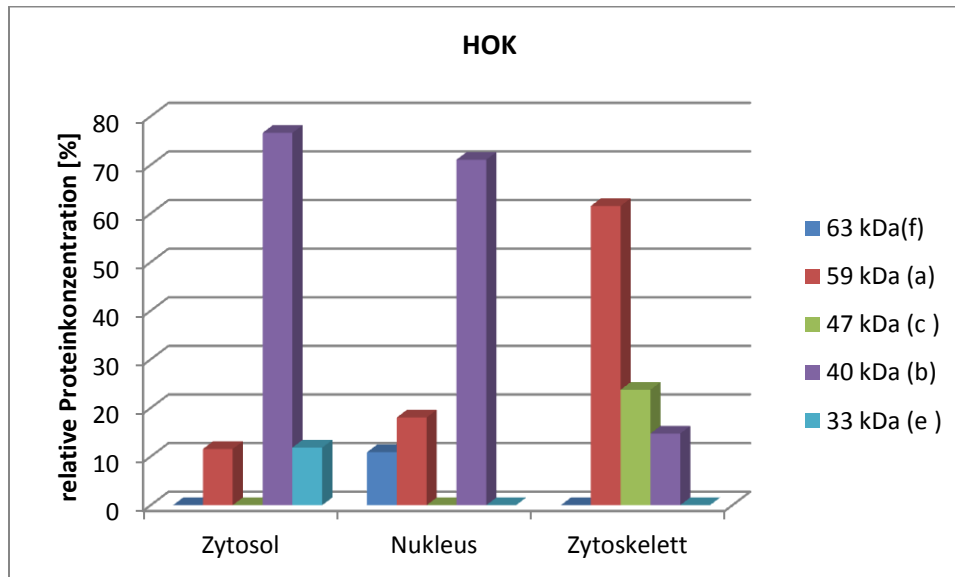
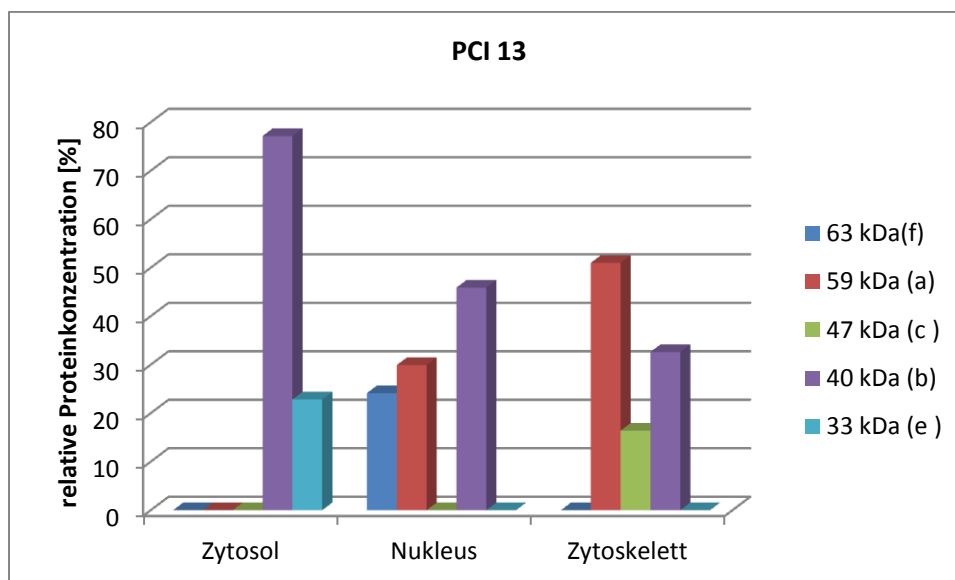


Abbildung 6: Subzelluläre Fraktionen von PCI 68 mit dem HECA-AK von Santa Cruz (Verdünnung 1:800). Aufgrund einer zu geringen Ausbeute bei der Isolation der einzelnen Fraktionen wurde jeweils die maximal mögliche Proteinmenge aufgetragen: Fraktion Zytosol 18,3µg, Nukleus 24,5µg und Zyto-skelett 11,9µg. Zusätzliche Bestätigung, dass die untersuchten Fraktionen korrekt voneinander isoliert wurden durch den Nachweis von beta-Actin in Zytosol und Zyto-skelett, sowie von Histon H3 in der nukleären Fraktion.

Exemplarisch sei die Verteilung der verschiedenen HECA-Proteinvarianten in den unterschiedlichen subzellulären Fraktionen von HOK und PCI 13 nach densitometrischer Analyse grafisch dargestellt. Im Kompartiment von Membran und Organellen erfolgte keine densitometrische Untersuchung, da hier in jeder Zelllinie ausschließlich die 40 kDa-Variante detektiert wurde.



Grafik 5: Dargestellt ist die prozentuale Expression der unterschiedlichen HECA-Proteinvarianten in den jeweiligen subzellulären Fraktionen von HOK nach densitometrischer Analyse relativ zum Housekeeping-Protein β -Aktin.



Grafik 6: Dargestellt ist die prozentuale Expression der unterschiedlichen HECA-Proteinvarianten in den jeweiligen subzellulären Fraktionen von PCI 13 nach densitometrischer Analyse relativ zum Housekeeping-Protein β -Aktin.

3.1.3 Abhängigkeit der HECA-Expression von der Zelldifferenzierung

Aus Zellen der Zelllinien PCI 13 und PCI 52 wurden in unterschiedlichen Konfluenzstadien Ganzzell-Proteinlysate gewonnen und mittels Westernblots mit dem Antikörper von Santa Cruz untersucht. Als Konfluenz wird dabei die dichtest mögliche Anordnung der kultivierten adhärennten Zellen an der Oberfläche des Kulturgefäßes bezeichnet. Ist die Oberfläche des Gefäßes nun relativ dicht bewachsen, besteht nur noch geringfügig Platz für weiteres Zellwachstum. Durch den engen Kontakt der Zellen zueinander kommt es zu einer Kontaktinhibition der Zellen und diese stellen somit die Zellteilung ein. Es tritt somit eine Differenzierung der Zellen ein. In diesen Versuchen wurde die HECA-Expression in verschiedenen Konfluenzstadien und so auch die Abhängigkeit der Proteinexpression vom Grad der Differenzierung analysiert.

Es konnten dabei in der Expression des HECA-Proteins deutliche Unterschiede erkannt werden. Relativ zum Housekeeping-Protein β -Aktin nimmt die Expression aller HECA-Varianten mit steigender Konfluenz zu. Besonders prominent ist die Zunahme der 40 kDa- (**Abb. 7, Bande b**), der 47 kDa- (**Abb. 7, Bande c**) und vor allem der 45 kDa-Varianten (**Abb. 7, Bande d**), welche sich in nachfolgenden Untersuchungen als ein deglykosyliertes HECA-Peptid herausstellte. Dies konnte auch in einer densitometrischen Untersuchung bei PCI 52 gezeigt werden (**Grafik 7**). Aufgrund der Unschärfe der 59 kDa-Variante (**Abb. 7, Bande a**) konnte hier keine densitometrische Analyse durchgeführt werden.

Bei PCI 13 konnte augenscheinlich nur eine leichte Steigerung der HECA-Expression detektiert werden, welche aufgrund der sehr schwachen β -Aktin Bande nicht densitometrisch quantifiziert werden konnte (**Abb. 7, Bande β -Aktin**).

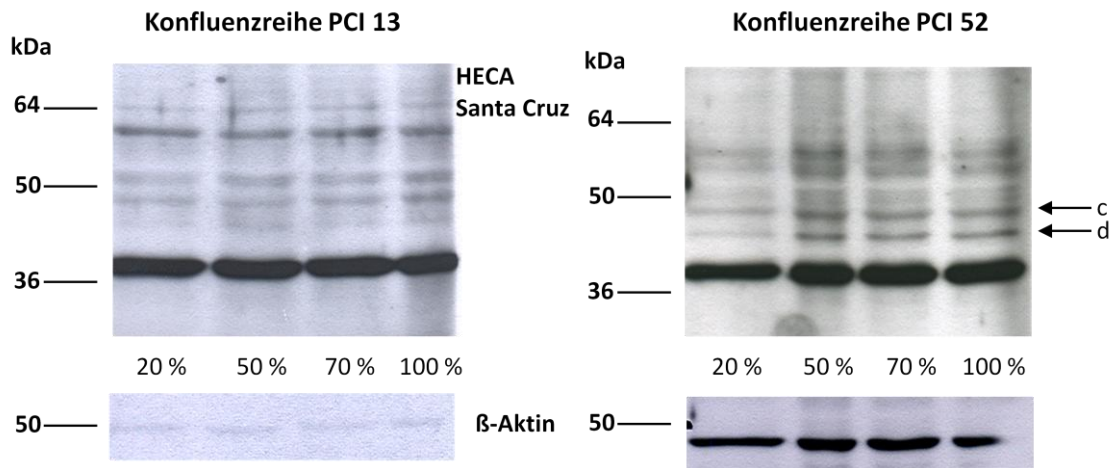
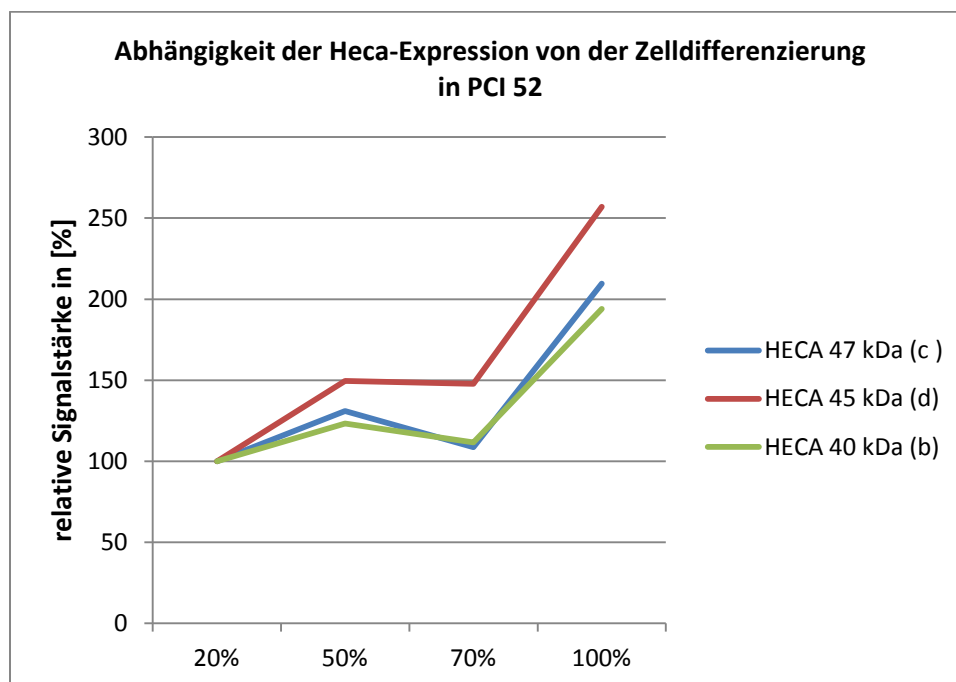


Abbildung 7: HECA-Expression in Proteinlysaten gewonnen aus unterschiedlich konfluenten Zellen der Zelllinien PCI 13 und PCI 52 mit dem HECA-AK von Santa Cruz (Verdünnung 1:1000) relativ zum Housekeepingprotein beta-Actin. Die Proteinmenge beträgt pro Spur 35 μ g.



Grafik 7: Abhängigkeit der HECA-Expression der 40 kDa-, 45 kDa und der 47 kDa-Variante vom Grad der Zelldifferenzierung. Densitometrische Auswertung der Proteinexpression im Verhältnis zum Housekeepingprotein β -Aktin.

Im Weiteren wurde die Abhängigkeit der HECA-Expression von der Differenzierung der HOK-Zellen untersucht. Dabei konnte zunächst mit dem HECA-AK von Abnova festgestellt werden, dass es bei einer durch eine 1,5mM CaCl_2 -Lösung ausgelösten Differenzierung von HOKs zu einer gesteigerten Expression der kurzen 40 kDa-HECA-Variante kommt (**Abb. 8, Bande b**), während die Expression von β -Aktin abnimmt. Zur längeren Variante kann aufgrund der schwachen Detektion keine Aussage gemacht werden (**Abb. 8, Bande a**).

Jedoch kann bei Verwendung des Antikörpers von Santa Cruz bei den ausdifferenzierten Zellen eine gesteigerte Expression sowohl des 59 kDa Volllänge Proteins (**Abb. 9, Bande a**) als auch der 47 kDa-Variante (**Abb. 9, Bande c**), bei ebenfalls geringerer β -Aktin-Expression detektiert werden. Unterschiede bei der 40 kDa-Variante sind aufgrund ihrer starken Expression mit diesem Antikörper augenscheinlich nicht zu erkennen (**Abb. 9, Bande b**).

Diese Ergebnisse sind sowohl bei Betrachtung der durchgeführten Immunoblots ersichtlich als auch konnten sie nach einer densitometrischen Quantifizierung bestätigt werden (**Grafik 8**).

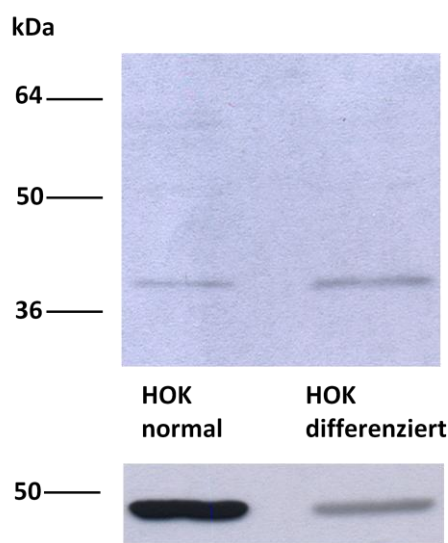


Abbildung 8: Differenzierungsanalyse von HOK mit HECA-AK von Abnova (Konz. 1:1500) relativ zum Housekeepingprotein beta-Actin. Die Proteinmenge beträgt pro Spur 35 μg .

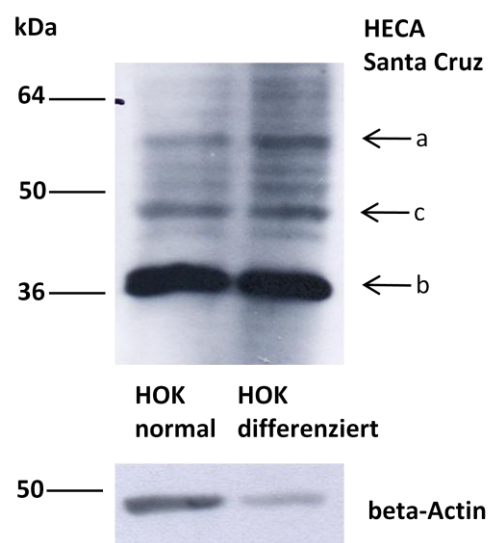
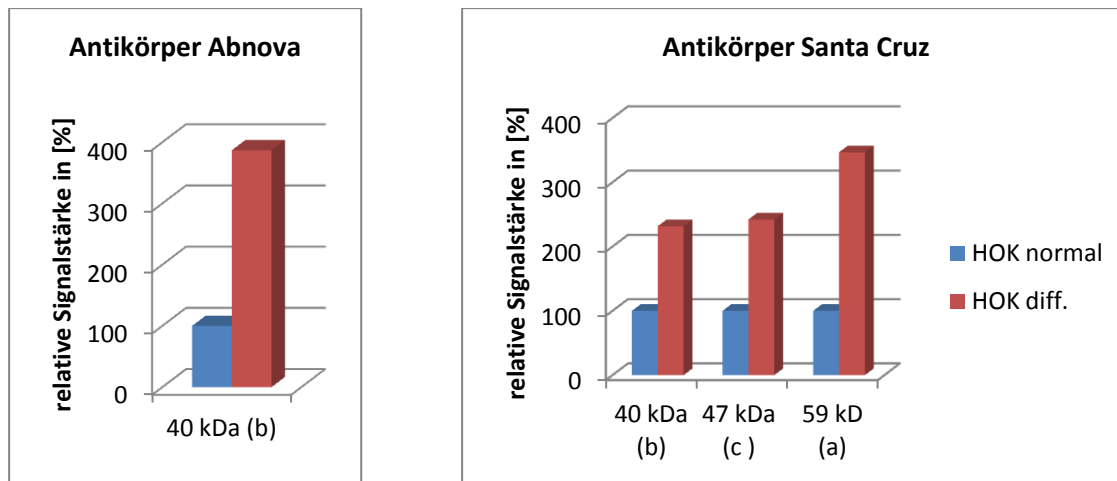


Abbildung 9: Differenzierungsanalyse von HOK mit HECA-AK von Santa Cruz (Konz. 1:1000) relativ zum Housekeepingprotein beta-Actin. Die Proteinmenge beträgt pro Spur 35 μg .



Grafik 8: Densitometrische Quantifizierung der Expression der einzelnen HECA-Proteinvarianten in normalen und differenzierten HOKs. Dargestellt ist im linken Diagramm die Quantifizierung der 40 kDa-Variante auf Grundlage der Ergebnisse des HECA-AKs von Abnova. Das rechte Diagramm zeigt die densitometrische Analyse der 40 kDa-, der 47 kDa- sowie der 59 kDa-Variante beruhend auf den Ergebnissen des HECA-AKs von Santa Cruz.

3.1.4 Nachweis von glykosylierten HECA-Proteinvarianten

Da in den vorangegangenen Untersuchungen mehrere Varianten des HECA-Proteins detektiert wurden, sollten diese auf eventuelle posttranslationale Glykosylierungen untersucht werden. Es konnte gezeigt werden, dass nach einer enzymatischen Deglykosylierung zwei zusätzliche Varianten detektiert werden konnten. Zum einen die bereits erwähnte Form mit 45 kDa (**Abb. 10, Bande c**), zum anderen ein kleines Protein mit 33 kDa (**Abb. 10, Bande e**).

Bei den einzelnen untersuchten Ganzellproteinlysaten von HOK, PCI 13 und PCI 68 konnten diese deglykosylierten Formen gefunden werden (**Abb. 10, Bande d und e**).

Zudem treten diese glykosylierten Formen in allen untersuchten subzellulären Proteinlösungen (PCI 68 Fraktion Zytosol und Zytoskelett, HOK Fraktion Zytosol) noch deutlicher auf (**Abb. 11, Bande d und e**). Das deglykosylierte 33kDa-Protein tritt zudem in der Zelllinie PCI 4A auf (**Abb. 1, Bande e**). Die andere deglykosylierte Variante mit der Proteingröße 45 kDa tritt in der entdifferenzierten Zelllinie PCI 52 auf (**Abb. 1, Bande d**).

Glykosylierte Proteine weisen wegen ihrer Zuckerreste ein um mindestens 0,8 kDa höheres Molekulargewicht auf. Bei O-glykosylierten Proteinen kann aber auch das Molekulargewicht nur um 0,2 kDa steigen (Jensen 2006). Aufgrund ihres folglich kleineren Molekulargewichts wandern deglykosylierte Peptide im SDS-Gel schneller, sodass hier die entsprechenden

glykosylierten Formen vermutlich bei 40 kDa (**Abb. 10 und 11, Bande b**) und bei 47 kDa (**Abb. 10 und 11, Bande c**) liegen.

Eine Positivkontrolle zur Deglykosylierung wurde mit Fetuin durchgeführt. Hier zeigt die Bande **h** in **Abb. 11** die deglykosylierte Form an, während die Bande **i** unbehandeltes (glykosyliertes) Fetuin darstellt.

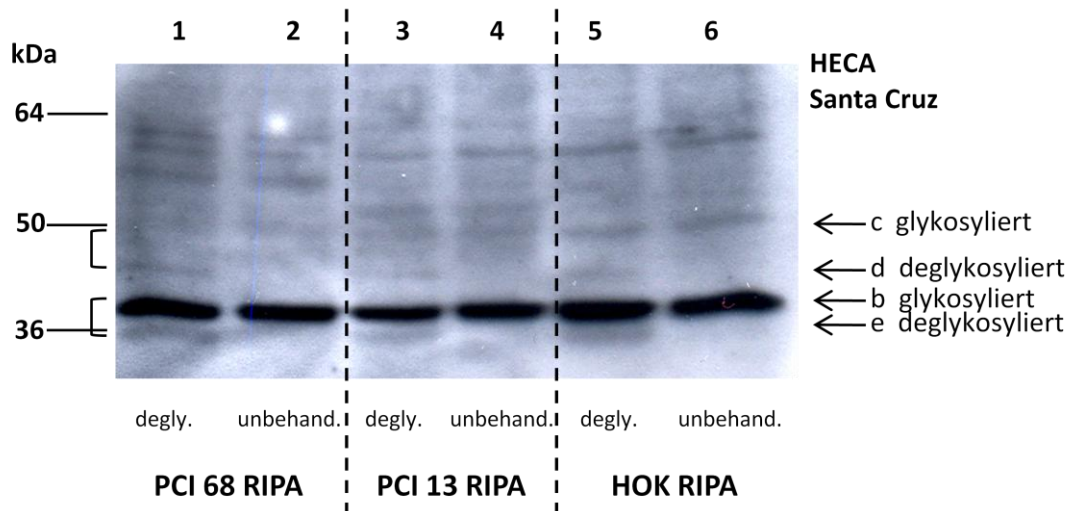


Abbildung 10: Enzymatische Deglykosylierung von Ganzzellproteinlysaten der Zellen PCI 68, PCI 13 und HOK und anschließender Westernblotanalyse mit dem HECA-AK von Santa Cruz (Verdünnung 1:800). Spur 1, 3, 5 zeigt die HECA-Expression in den deglykosylierten Fraktionen im Vergleich zu den unbehandelten Proben in Spur 2, 4, 6. Die eingesetzte Proteinkonzentration beträgt jeweils 18,8 µg.

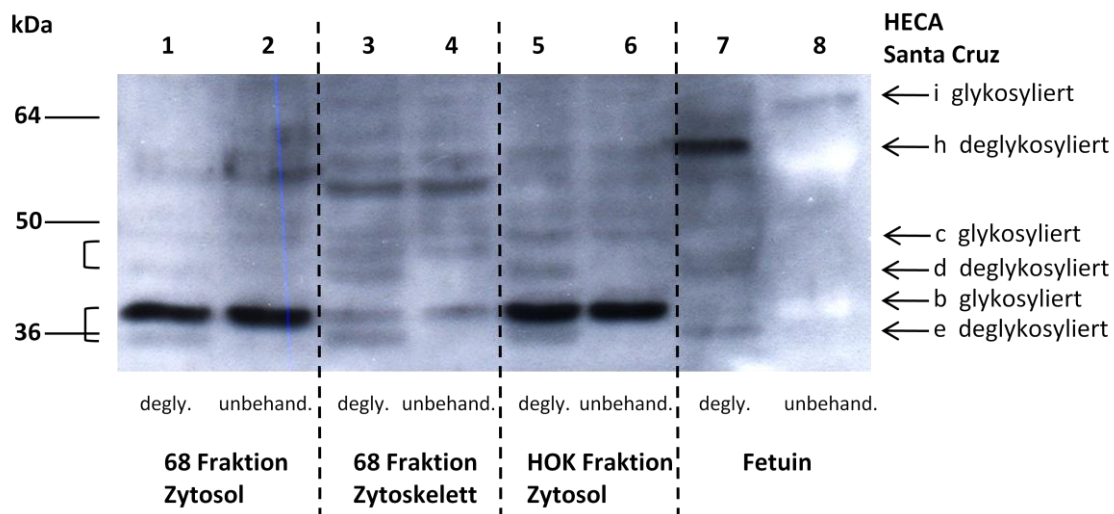


Abbildung 11: Enzymatische Deglykosylierung von subzellulären Proteinlysaten der Zellen PCI 68 und HOK und anschließender Westernblotanalyse mit dem HECA-AK von Santa Cruz (Verdünnung 1:800). Spur 1, 3, 5 zeigt die HECA-Expression in den deglykosylierten Fraktionen im Vergleich zu den unbehandelten Proben in Spur 2, 4, 6. Als Kontrolle des Deglykosylierungsvorgangs dient die Probe mit Fetuin. Die eingesetzte Proteinkonzentration beträgt bei den einzelnen Fraktionen jeweils 5,4 µg, bei Fetuin 3,75 µg.

3.1.5 Analyse von phosphorylierten HECA-Varianten in Ganzzellproteinlysaten und in subzellulären Proteinlysaten

Aus der Literatur ist bekannt, dass HECA vermutlich in der G1-Phase phosphoryliert wird (Dephoure et al. 2008). Daher wurde im Folgenden untersucht, ob sich unter den dargestellten HECA-Proteinvarianten phosphorylierte Formen befinden. Nach enzymatischer Dephosphorylierung der Zelllysate von PCI 13, PCI 52 und PCI 68 mittels λ -Phosphatase konnten allerdings keine Unterschiede im Bandenmuster vor und nach Behandlung nachgewiesen werden. Der Versuchsaufbau dazu wurde mehrfach modifiziert, worauf in der Diskussion näher eingegangen werden soll. Exemplarisch sei in **Abb. 12** folgender Westernblot dargestellt.

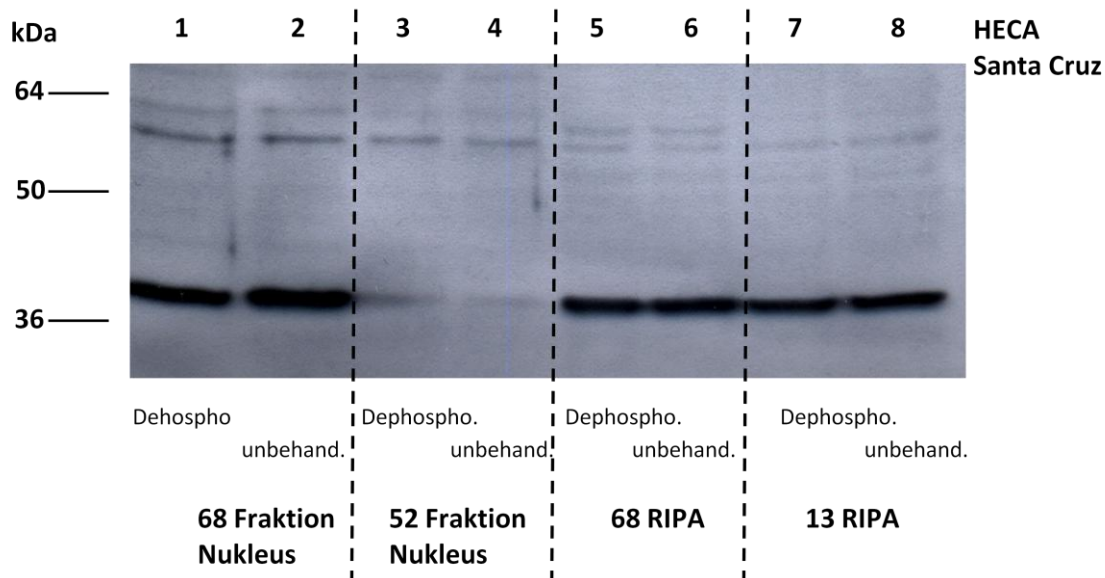


Abbildung 12: Enzymatische Dephosphorylierung von Proteinlysaten der nukleären Fraktionen von PCI 52 und PCI 68 sowie von Ganzzellproteinlysaten von PCI 13 und PCI 68 mit dem HECA-AK von Santa Cruz (Verdünnung 1:800). Spur 1, 3, 5, 7 zeigt die HECA-Expression in den mit λ -Phosphatase behandelten Proteinlysaten im Vergleich zu den unbehandelten Proben in Spur 2, 4, 6, 8. Die eingesetzte Proteinmenge betrug bei PCI 68 Fraktion Nukleus 16,75 μ g, bei PCI 52 Fraktion Nukleus 6,5 μ g, sowie bei den eingesetzten RIPAs von PCI 13 und PCI 68 40 μ g.

3.2 Analyse der mRNA-Expression von HECA mittels qualitativer und quantitativer PCR

Aus Kulturen von NHEKs und HOKs sowie den Tumorzelllinien PCI 1, PCI 4-1, PCI 4A, PCI 9, PCI 13, PCI 15, PCI 52 und PCI 68 wurde Gesamt-RNA isoliert. Diese wurde anschließend in cDNA umgeschrieben, um mit dieser qualitative und quantitative PCR-Analysen durchzuführen. Dazu wurden spezifische PCR-Primer (siehe Material & Methoden, Punkt 2.4.3) konstruiert, um via PCR die Existenz des jeweils untersuchten mRNA-Abschnitts nachzuweisen. Von einer RNA-Isolierung/ cDNA-Probe wurden mit dem Lightcycler jeweils drei qPCR-Läufe durchgeführt und die relative Expression dieses cDNA-Abschnitts zwischen den einzelnen Tumorzelllinien und den HOKs verglichen.

3.2.1 Untersuchung der mRNA-Expression des Volllänge-Transkripts vom HECA-Gen in normalen Keratinozyten und verschiedenen Tumorzelllinien



Grafik 9: Dargestellt ist das vermutete HECA-Transkript zusammengesetzt aus seinen vier Exonen. Der untranslatierte Bereich (UTR) ist kleiner dargestellt. Anschaulich eingezeichnet sind die Bindungsstellen des Primerpaares HECA Ex 3-4.

Das Primerpaar HECA Ex 3-4 bindet mit seinem Forward-Primer im dritten Exon, mit seinem Reverse-Primer im vierten Exon. Die Verwendung dieses Primerpaares repräsentiert die Expression des Volllänge-Transkripts des HECA-Gens. Die Existenz dieses Transkripts konnte in allen untersuchten cDNA-Proben der untersuchten Zelllinien nachgewiesen werden.

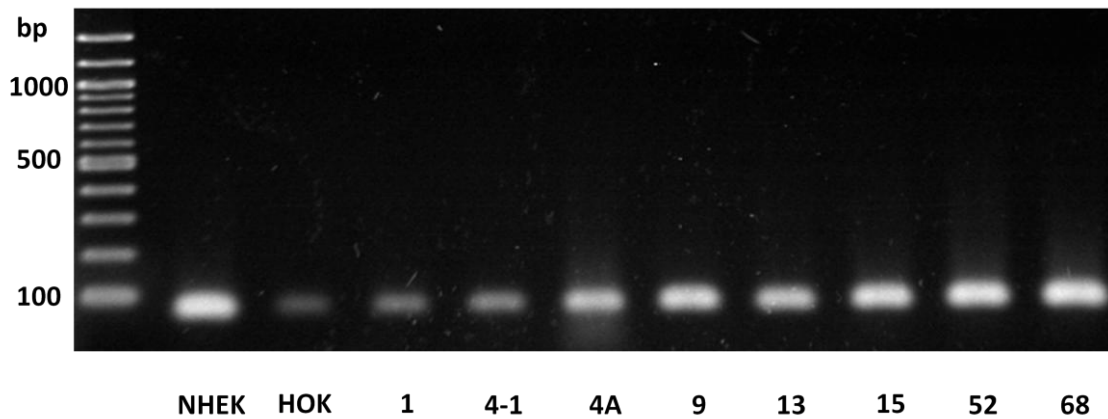
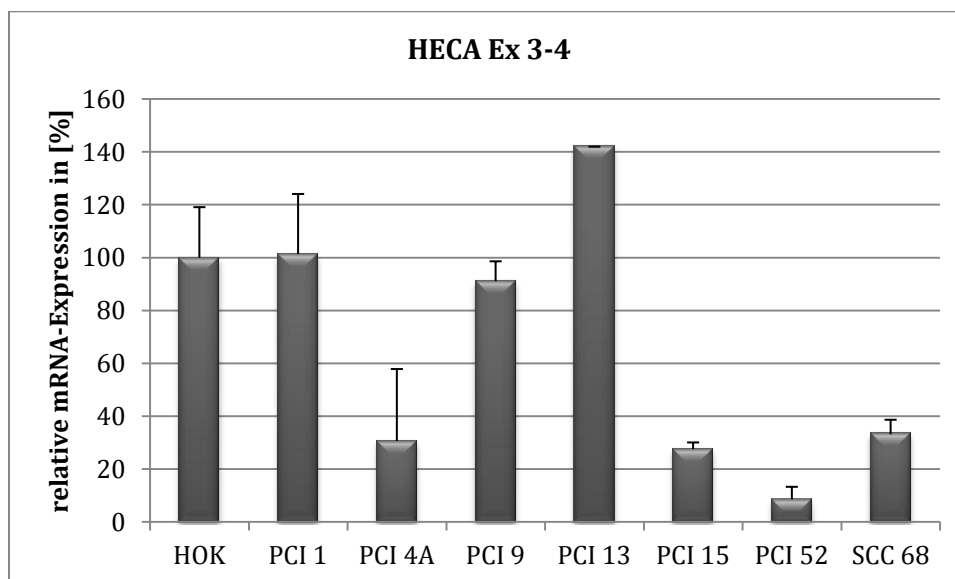


Abbildung 13: PCR-Analyse der mRNA-Expression des HECA-Volllänge-Transkripts in NHEKs, HOKs und den verschiedenen Tumorzelllinien. Als Primerpaar wurde HECA EX 3-4 verwendet. Das Produkt besitzt eine Länge von 74 bp.

Um die Expression zwischen den einzelnen Zelllinien quantitativ vergleichen zu können, wurden qPCRs durchgeführt. Dabei wurde die Quantität der HECA-Expression relativ zur Expression des Housekeepinggens beta-Actin dargestellt.

Es zeigte sich dabei, dass sowohl in HOK als auch in den Tumorzelllinien PCI 1, PCI 9 und PCI 13 eine höhere mRNA-Expression für das HECA-Volllänge-Transkript vorliegt als in der Gruppe der Tumorzelllinien PCI 4, PCI 15, PCI 52 sowie PCI 68. Diesen Zusammenhang stellt **Grafik 10** dar.



Grafik 10: Quantitative PCR. Relative Expression des HECA-Volllänge-Transkripts in HOKs und den jeweiligen Tumorzelllinien. Es wurde das Primerpaar HECA Ex 3-4 verwendet, sowie ein beta-Actin Primerpaar zur Detektion des Housekeepinggens beta-Actin. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung aus drei Versuchsreihen.

3.2.2 Analyse putativer Spleißvarianten der HECA-mRNA

Ausgehend von verschiedenen Datenbankeinträgen (EC-Gene, UCSC, SIBI, Ace-View) über die Existenz unterschiedlicher HECA-Varianten wurden weitere spezifische PCR-Primer konstruiert, um diese putativen Transkripte experimentell nachzuweisen.



Grafik 11: Dargestellt ist das von SIBI errechnete alternative HECA-mRNA-Transkript zusammengesetzt aus seinen vier Exonen. Der kodierende Bereich ist breiter dargestellt als der untranslatierte Bereich (UTR). Anschaulich eingezeichnet sind die Bindungsstellen der Primerpaare HECA T2a und HECA T2b.

SIBI hat für *HECA* drei alternative Transkripte errechnet. Ein Transkript müsste dabei dem bereits bekannten Volllänge-Transkript entsprechen. Für den Nachweis dieses Transkripts wurden die Primerpaare HECA T2a und HECA T2b konstruiert. Dadurch sollte gezeigt werden, dass sich stromabwärts der vier translatierten Exone auf mRNA-Ebene in Exon 4 noch ein untranslatierter Bereich befindet. Wegen der Länge dieser nicht kodierenden Region wurde der Nachweis auf zwei Primerpaare verteilt, wie **Grafik 11** zeigt. Durch die Primerpaare HECA T2a und HECA T2b konnte die theoretische Annahme von SIBI verifiziert werden.

Beim Primerpaar HECA T2a befindet sich der Forward-Primer gegen Ende des zweiten Exons, der Reverse-Primer zu Beginn der non-coding region in Exon 4. Dabei konnte bei allen untersuchten Zelllinien das Hauptprodukt bei 751 bp nachgewiesen werden. Zudem existiert ein Produkt mit ca. 700 bp bei allen Zelllinien außer PCI 4A.

Das Produkt mit 751 bp korreliert in den Immunoblots mit dem HECA-Volllänge-Protein bei 59 kDa (**Abb. 1 und 2, Bande a**). Das etwas kürzere Transkript könnte mit dem in den subzellulären Fraktionen im Zytoskelett bei PCI 52 und PCI 68 beobachteten HECA-Protein bei 57 kDa in Verbindung gebracht werden (**Abb. 5 und 6, Bande g**). Es besteht allerdings auch eine weitere Möglichkeit der Interpretation. So könnte das kürzere Transkript mit dem HECA-Volllänge-Protein korrelieren und das längere Transkript mit der 63 kDa-Variante, die sich vor allem in den nukleären Fraktionen zeigte (**Abb. 3, 4 und 6, Bande f**). Für das Auftreten dieser HECA-Proteinvarianten müssen aber auch posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierungs- und Glykosylierungsprozesse in Betracht gezogen werden.

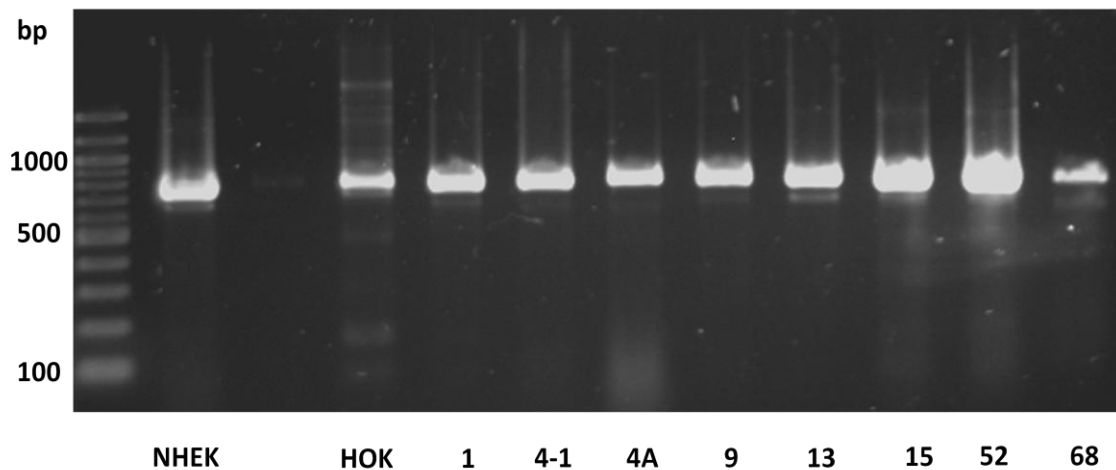
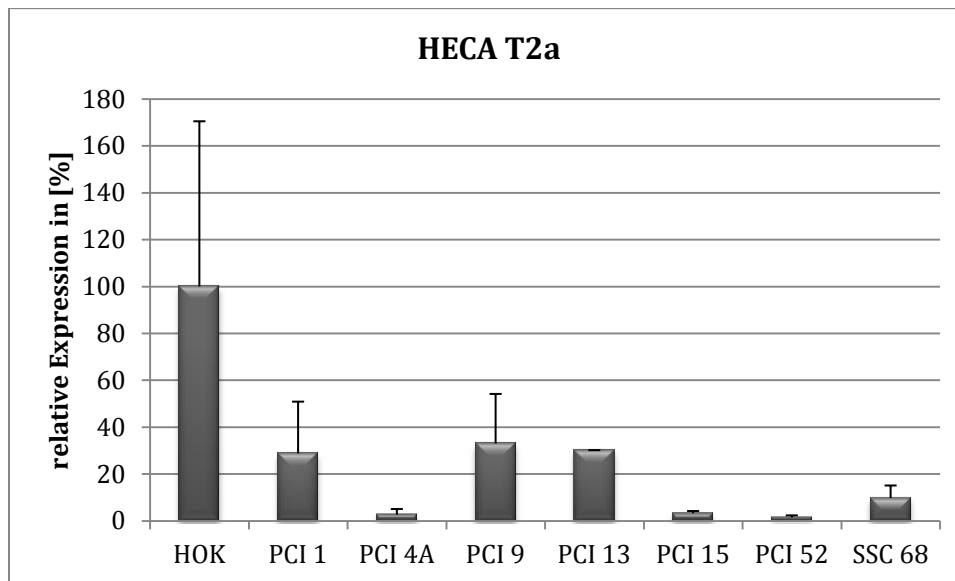


Abbildung 14: PCR-Analyse der mRNA-Expression des HECA-Volllänge-Transkripts in NHEKs, HOKs und den verschiedenen Tumorzelllinien. Als Primerpaar wurde HECA T2a verwendet. Das Hauptprodukt besitzt eine Länge von 751 bp. Zudem existiert ein weiteres Produkt bei ca. 700 bp.

Vergleicht man die Expression der vom Primerpaar HECA T2a amplifizierten Transkripte quantitativ, so zeigte sich die stärkste Expression bei HOK. In der Gruppe der Tumorzelllinien PCI 1, PCI 9 und PCI 13 ist das Produkt in einer niedrigeren Konzentration vorhanden. Nochmals in einem geringeren Umfang wird dieses Transkript in der Gruppe der Tumorzelllinien PCI 4, PCI 15, PCI 52 und PCI 68 detektiert (**Grafik 12**).

Diese quantitative Expression der HECA T2a Transkripte sollte annähernd mit den für das Primerpaar HECA Ex 3-4 gewonnenen Ergebnissen übereinstimmen. Für die Tumorzelllinien kann dies bestätigt werden. Bei den HOKs ist die hier verhältnismäßig starke Expression dieses Transkripts wahrscheinlich auf unspezifische Produkte des Primerpaares HECA T2a zurückzuführen, wie in **Abb. 14** in der PCR ersichtlich wird.



Grafik 12: Quantitative PCR. Relative Expression des HECA-Volllänge-Transkripts in HOK und den jeweiligen Tumorzelllinien. Es wurde das Primerpaar HECA T2a verwendet, sowie ein beta-Actin Primerpaar zur Detektion des Housekeepinggens beta-Actin. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung aus drei Versuchsreihen.

Für den Nachweis des untranslatierten Bereichs des langen HECA-Transkripts in Exon 4 wurde zudem das Primerpaar HECA T2b verwendet. Sowohl Forward- als auch Reverse-Primer binden in der non-coding region (stromabwärts des Stopcodons) des vierten Exons. In den PCR-Reaktionen konnte dabei mit Ausnahme von PCI 4-1 und PCI 4A die Existenz dieses Transkripts nachgewiesen werden, wie **Abb. 15** zeigt.

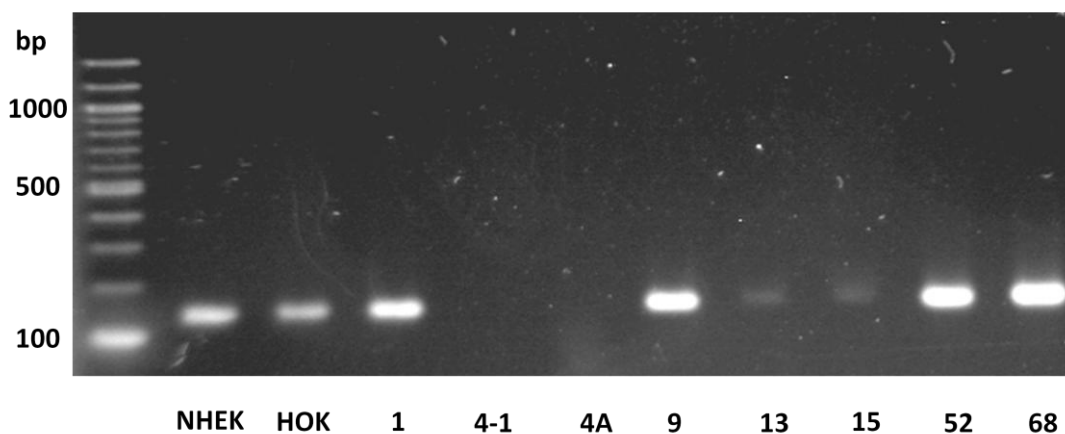
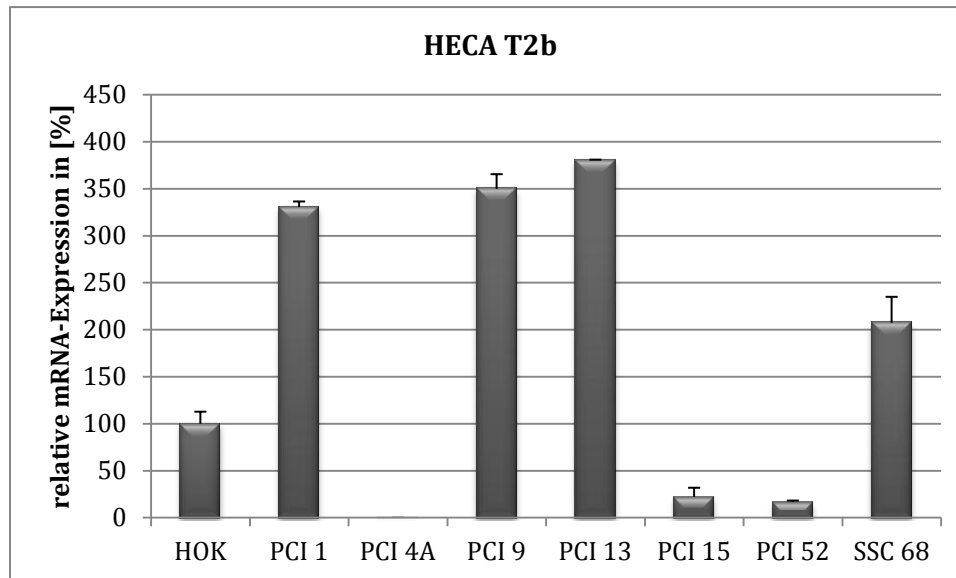


Abbildung 15: PCR-Analyse der mRNA-Expression des HECA-Volllänge-Transkripts in NHEKs, HOKs und den verschiedenen Tumorzelllinien. Als Primerpaar wurde HECA T2b verwendet. Das Produkt besitzt eine Länge von 131 bp.

In den vergleichenden Untersuchungen mittels qPCR konnten folgende Ergebnisse detektiert werden: Am höchsten lag die HECA-Expression für das Primerpaar HECA T2b in den

Tumorzelllinien PCI 1, PCI 9, PCI 13 und PCI 68. Die Expression in HOKs fiel geringer aus. Nochmals geringer fiel die Expression in der Gruppe der Tumorzelllinien PCI 4A (nicht vorhanden), PCI 15 und PCI 52 aus (**Grafik 13**).



Grafik 13: Quantitative PCR. Relative Expression des HECA-Volllänge-Transkripts in HOK und den jeweiligen Tumorzelllinien. Es wurde das Primerpaar HECA T2b verwendet, sowie ein beta-Actin Primerpaar zur Detektion des Housekeepinggens beta-Actin. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung aus drei Versuchsreihen.

Um die von den Datenbanken angegebenen Spleißvarianten zu analysieren, wurden weitere Primer konstruiert. Dabei handelt es sich um die von SIBI angegebene putative Spleißvariante I. Diese unterscheidet sich vom HECA-Volllänge-Transkript dadurch, dass vom vierten Exon nach dem Spleißvorgang nur der Anfangsbereich übrig bleibt.

Die von EC-Gene angegebenen Spleißvariante II besteht nach dem Spleißen vereinfacht dargestellt aus den Exonen 2 und 3 und umfasst 1175 bp. Dabei beginnt diese mRNA-Variante in Exon 2 erst ab dem 80. Nukleotid und setzt sich in Exon 3 über das konventionelle Ende von Exon 3 um 68 Nukleotide fort.

HECA-Volllänge-Transkript**Spleißvariante I (Swiss Institute of Bioinformatics)****Spleißvariante II (EC-Gene)**

Grafik 14: Dargestellt ist das HECA-Volllänge-Transkript mit seinen putativen Spleißvarianten I und II. Zudem ist in Klammern die Anzahl der Nukleotide pro Exon gezeigt. Anschaulich eingezeichnet sind ebenso die Primerpaare HECA T3 und HECA Ex3aI.

Zur Analyse der von SIBI angegebenen putativen Spleißvariante I wurde das Primerpaar HECA T3 konstruiert. Dabei bindet der Forward-Primer am Ende des dritten Exons, der Reverse-Primer bindet intronübergreifend sowohl am Ende von Exon 3 als auch zu Beginn von Exon 4. Neben einem Hauptprodukt bei 142 bp, das in allen untersuchten Zelllinien vorhanden ist, treten weitere Produkte auf (**Abb. 16**). So kann bei ca. 300 bp eine Bande detektiert werden, die nur bei NHEK fehlt. Diese erscheint vor allem bei HOK besonders stark, was anschließende qPCR-Untersuchungen bestätigen. Bei PCI 4 und PCI 52 fehlt dieses Produkt ebenfalls, es kann aber eine geringfügig längere Nukleotidsequenz mit ca. 330 bp detektiert werden. Weiterhin existiert bei HOK, PCI 1, PCI 9 und PCI 13 ein Produkt mit einer Länge von ca. 500 bp. Diese Analyse lässt auf die Existenz zusätzlicher HECA-Transkripte schließen, welche vermutlich ein längeres Exon 3 aufweisen.

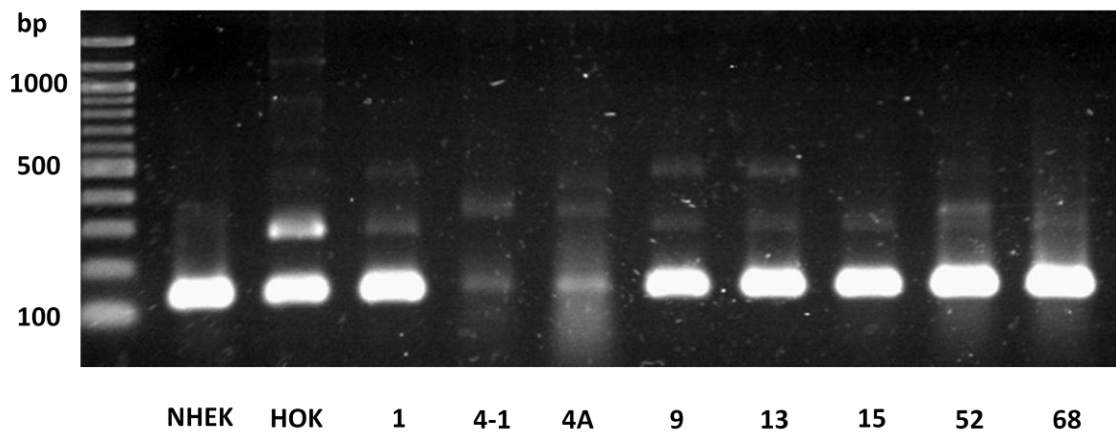
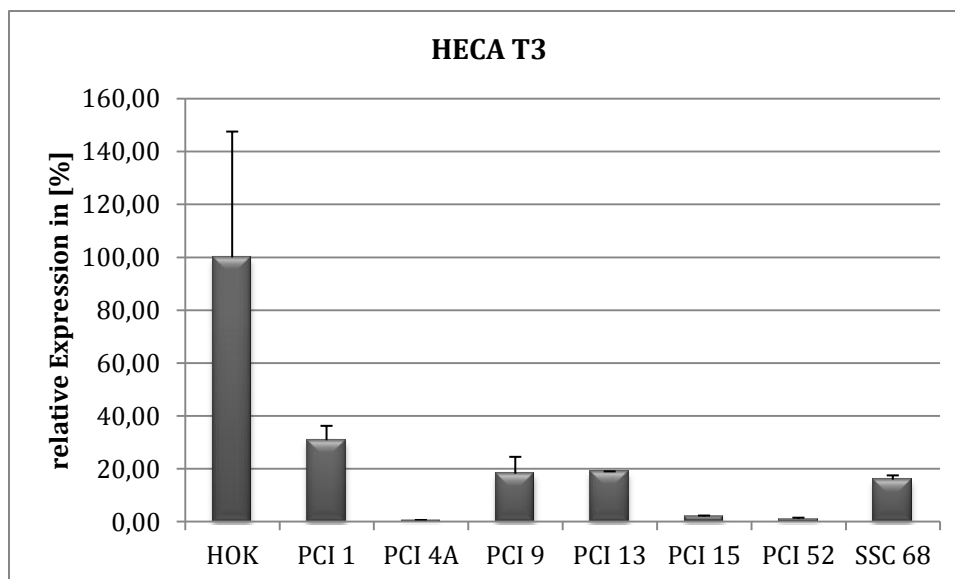


Abbildung 16: PCR-Analyse der mRNA-Expression der HECA-Spleißvariante I in NHEKs, HOKs und den verschiedenen Tumorzelllinien. Als Primerpaar wurde HECA T3 verwendet. Das Hauptprodukt besitzt eine Länge von 142 bp. Zudem existiert ein weiteres Produkt bei ca. 300 bzw. 330 bp. Bei ca. 500 bp kann ein weiteres Produkt detektiert werden.

Bei der Quantifizierung der Produkte durch qPCRs ergeben sich ähnliche Ergebnisse hinsichtlich der HECA-Expression wie für das Primerpaar Heca T2a. HECA wird in HOK am stärksten exprimiert. In der Gruppe der Zelllinien PCI 1, PCI 9, PCI13 und PCI 68 fällt die HECA-Expression geringer aus. In den übrigen Tumorzelllinien PCI 4A, PCI 15 und PCI 52 wird die geringste HECA-Expression detektiert.



Grafik 15: Quantitative PCR. Relative Expression der HECA-Spleißvariante I in HOK und den jeweiligen Tumorzelllinien. Es wurde das Primerpaar HECA T3 verwendet, sowie ein beta-Actin Primerpaar zur Detektion des Housekeepinggens beta-Actin. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung aus drei Versuchsreihen.

Die gesteigerte Expression in HOK könnte auf die Anwesenheit von zusätzlichen HECA-Transkripten zurückgeführt werden. Das Transkript mit der 300 bp Größe könnte vor allem zur Expression der bei HOK detektierten 47 kDa-Proteinvariante (**Abb. 2, 3 und 9, Bande c**) führen.

Für den Nachweis der von EC-Gene angegebenen HECA-Spleißvariante II wurde das Primerpaar HECA Ex3al konstruiert. Dabei bindet der Forward-Primer in Exon 3 und der Reverse-Primer in dem zuvor dargestellten verlängerten Abschnitt von Exon 3. Bei allen untersuchten Zelllinien mit Ausnahme von PCI 4 tritt ein Produkt mit 150 bp auf. Dies stellt somit einen Beweis für die Existenz dieser Spleißvariante dar.

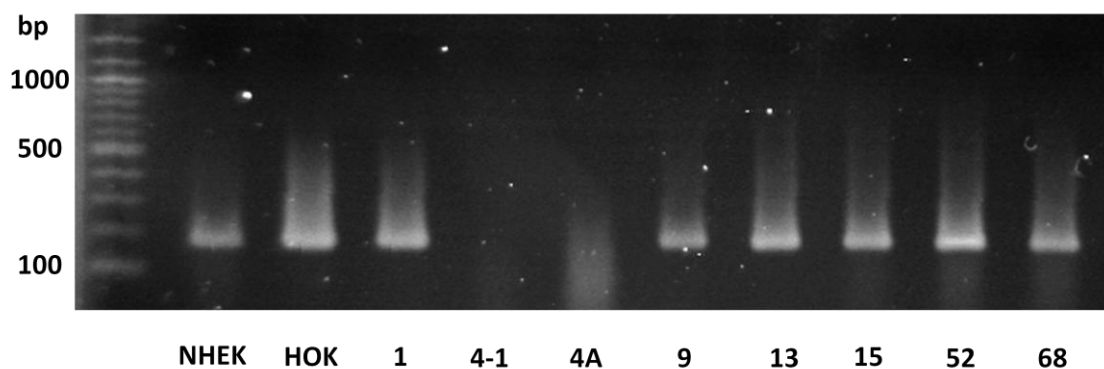
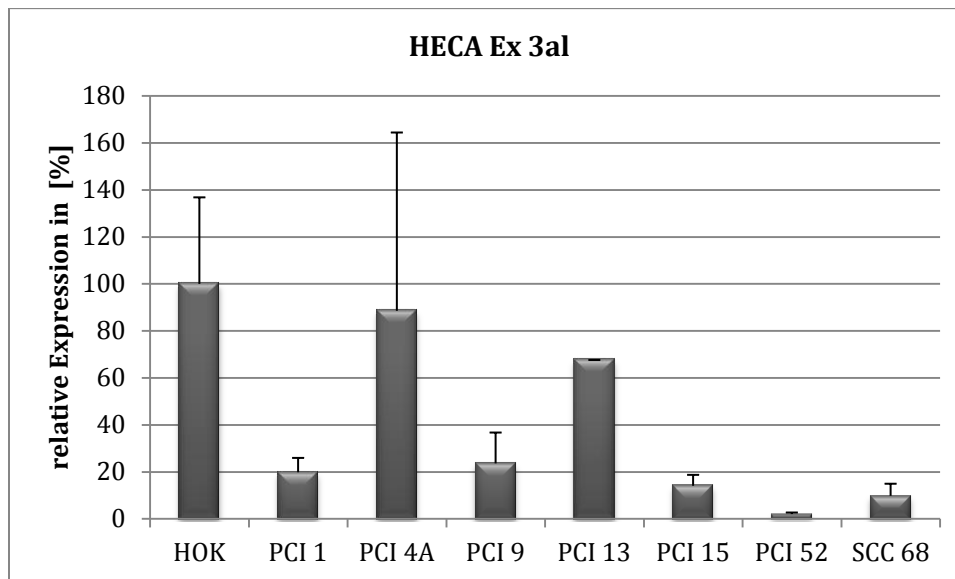


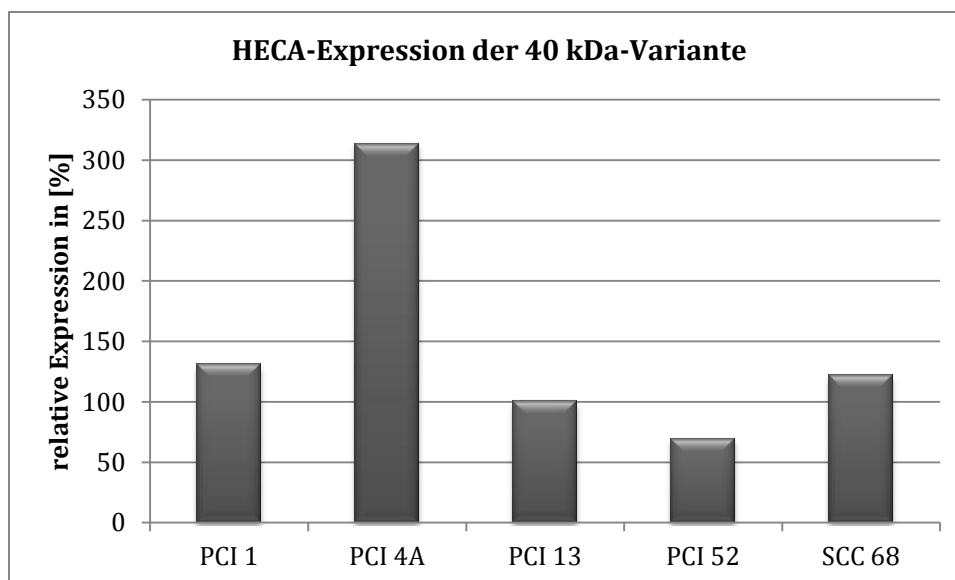
Abbildung 17: PCR-Analyse der mRNA-Expression der HECA-Spleißvariante II in NHEKs, HOKs und den verschiedenen Tumorzelllinien. Als Primerpaar wurde Heca Ex3al verwendet. Das Produkt besitzt eine Länge von 150 bp. Mit Ausnahme von PCI 4 kann dieses Transkript in allen Zelllinien nachgewiesen werden.

Analysiert man dieses Transkript quantitativ mittels qPCR, so zeigt sich, dass die stärkste HECA-Expression in HOKs, PCI 4A und mit Abstrichen PCI 13 auftritt. In den übrigen Tumorzelllinien fällt die HECA-Expression sehr gering aus (**Grafik 16**).

Die Expression dieses Transkripts scheint in den Immunoblots mit der Expression der 40 kDa-Proteinvariante zu korrelieren (**Abb. 1 und 2, Bande b**). Auch bei den Immunoblots mit dem HECA-Ak von Abnova befand sich die stärkste Expression der 40 kDa-Variante bei PCI 4A und bei HOK (**Abb. 1 und 8, Bande b**). In den übrigen Zelllinien war die Expression der 40 kDa-Variante geringer (**Abb. 1, Bande b**). Dies konnte bei den Tumorzelllinien in einer densitometrischen Analyse gezeigt werden (**Grafik 17**). Bei HOK war dies im Vergleich zu den Tumorzelllinien nicht möglich, da die Versuche nicht in einem Lauf mit den Tumorzelllinien durchgeführt wurden und so nicht densitometrisch miteinander verglichen werden konnten.



Grafik 16: Quantitative PCR. Relative Expression der HECA-Spleißvariante II in HOK und den jeweiligen Tumorzelllinien. Es wurde das Primerpaar Heca Ex3aI verwendet, sowie ein beta-Actin Primerpaar zur Detektion des Housekeepinggens beta-Actin. Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung aus drei Versuchsreihen.



Grafik 17: Densitometrische Quantifizierung der Expression der 40 kDa-Variante des HECA-Proteins in den einzelnen Tumorzelllinien. Die densitometrische Analyse wurde auf Grundlage der in 3.1.1 durchgeführten Immunoblots mit dem HECA-Ak von Abnova durchgeführt.

4 Diskussion

4.1 Methodik

Die in dieser Arbeit vorgenommenen Versuche erfolgten auf der Basis von Zelllinien, die aus Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle und des Oropharynx gewonnen wurden (Heo et al. 1989). Zelllinien sind weit verbreitet in der Krebsforschung. Sie sind einfach zu behandeln, wachsen schnell und gewährleisten reproduzierbare Ergebnisse (Cree et al. 2010). Durch in vitro Untersuchungen an Zellkulturen besteht die Möglichkeit biologische Schlüsselprozesse wie Wachstum, Differenzierung und Apoptose zu untersuchen. Auch können genetische Veränderungen vorgenommen werden, um die Funktion eines bestimmten Gens zu analysieren (Cruz et al. 2009). Allerdings müssen die anhand von Zelllinien gewonnen Erkenntnisse auch noch *in vivo* bestätigt werden, da Unterschiede wie zum Beispiel in der Wachstumsrate oder bezüglich des Kulturmediums vorliegen (Cree et al. 2010).

4.1.1 Angewandte Methodik zur Analyse des alternativen Spleißverhaltens von HECA

In dieser Arbeit wurden alternative Spleißformen von *HECA* untersucht. Dies erfolgte basierend auf den Analysen der bioinformatischen Datenbanken NCBI, SIBI, EC Gene und AceView über alternative Spleißvarianten des *HECA*-Gens. Auf Grundlage dieser Daten sollten die putativen Spleißvarianten I und II experimentell in ReverseTranskriptase-PCRs nachgewiesen werden. Durch die Konstruktion entsprechender Primerpaare konnten die erwarteten spezifischen Produkte und somit die Spleißvarianten nachgewiesen werden. Diese Methodik gilt als experimenteller Nachweis bioinformatisch errechneter Spleißformen (Hui et al. 2004; Venables 2004; Hughes et al. 2006) und stellt eine sehr sensitive Methode für den Nachweis geringer mRNA-Mengen dar (Bustin 2002).

Durch die bioinformatische Detektion alternativer Spleißvarianten konnte das Wissen über alternative Spleißvarianten in großem Umfang erweitert werden. Durch die Anwendung geeigneter Datenbanken und einem entsprechenden Versuchsdesign ist es möglich, genomweit nach alternativen Spleißvarianten zu suchen, die charakteristisch für bestimmte Krankheiten sind (Kim & Lee 2008). In Studien konnte gezeigt werden, dass alternatives Spleißen durch vergleichende Analysen von Genomsequenzen bioinformatisch vorhergesagt werden kann (Lee

& Wang 2005). Auf der Grundlage dieser Datenbankeinträge erfolgt anschließend der experimentelle Nachweis durch RT-PCR oder Microarray (Kim & Lee 2008).

Bei den Microarrays werden zwei verschiedene Techniken unterschieden: Zum einen kann die Detektion anhand von PCR-Produkten erfolgen, zum anderen auch direkt durch Oligonukleotide mittels CGH (comparative genomic hybridization) (Cowell & Hawthorn 2007). Ein großer Vorteil der Microarrays liegt in der Möglichkeit eine Vielzahl von Genen parallel in einem einzigen Experiment zu untersuchen (Pioch et al. 2008). Mit dieser neuen Technik können somit genomweit genetische Veränderung detektiert werden (Waddel 2008). Allerdings soll in dieser Arbeit alleinig das *HECA*-Gen auf alternative Spleißvarianten untersucht werden, weshalb sich die Verwendung von RT-PCRs anbietet.

Der Nachweis von Spleißvarianten kann aber auch mittels *in situ*-Hybridisierung direkt am Gewebe erfolgen. Dies stellt eine sehr sensitive Technik dar, die die Detektion und die Lokalisierung von DNA- oder RNA-Molekülen in morphologisch konservierten isolierten Zellen, histologischen Gewebeschnitten oder Chromosomenpräparationen erlaubt. Sie wird in Gewebeproben u.a. zum Nachweis von mRNA-Transkripten und deren Verteilung eingesetzt (Nouri-Aria 2008). Zukünftig könnte mittels einer *in situ*-Hybridisierung die Verteilung der in dieser Arbeit nachgewiesenen *HECA*-mRNA-Varianten in der Zelle analysiert werden. Zudem könnte in Gewebe von verschiedenen Tumorstadien die Expression von *HECA*-mRNA untersucht werden.

Auch geeignet zur Detektion von alternativen Spleißvarianten ist das Northern-Blotting-Verfahren. Dabei können Rückschlüsse auf die Größe der mRNA und das Spleißverhalten gezogen werden. Diese Methode kann aber auch zur Quantifizierung der Transkription eingesetzt werden (Bustin 2000).

Mittels PCR konnte wie bereits dargestellt der Nachweis von verschiedenen mRNA-Spleißprodukten des *HECA*-Gens erbracht werden. Es sollte in dieser Arbeit weiterhin untersucht werden, ob sich die Expression der einzelnen Spleißprodukte quantitativ in den verschiedenen Tumorseiten unterscheidet. Dies erfolgte nach dem Prinzip der quantitativen Reverse-Transcriptase-PCR. Dies stellt die sensitivste Methode zur Detektion von geringen Mengen an mRNA-Substrat dar (Bustin 2000). Die RT-qPCR gilt als die Standardmethode zur quantitativen Analyse von mRNA-Proben in verschiedenen Gewebeproben (Bustin 2002) und wird u.a. zur Analyse der Genexpression eingesetzt (Smith & Osborn 2009).

Im Gegensatz zur PCR wird bei der quantitativen PCR nach jedem Zyklus mittels eines Fluoreszenzsignals die bereits erfolgte Produktakkumulation gemessen. Es werden dabei zwei Systeme unterschieden: das in dieser Arbeit verwendete SYBR Green (siehe 2.4.1) und das TaqMan UPL-Probensystem (Roche). TaqMan stellt zwar das etwas sensitivere System dar, allerdings waren für die in dieser Arbeit untersuchten Spleißprodukte keine TaqMan-UPL-Sonden erhältlich, sodass SYBR Green verwendet wurde. Durch eine zusätzlich durchgeführte Schmelzkurvenanalyse können aber putativ unspezifische Bindungen von SYBR Green sichtbar gemacht werden (Smith & Osborn 2009).

Die Quantifizierung der eingesetzten Probenmengen erfolgte mittels des Prinzips der relativen Quantifizierung. Bei der relativen Quantifizierung werden Veränderungen der unbekannten Probenmengen relativ zu einem mitamplifizierten Housekeepinggen ausgedrückt, unter der Prämisse, dass dessen Expression während des experimentellen Ansatzes konstant bleibt. Allerdings können Veränderungen in der Expression der Housekeepinggene somit auch zu veränderten Messergebnissen führen (Smith & Osborn 2009). Diese Versuchsstrategie mittels relativer Quantifizierung stellt bei Eukaryoten aber dennoch das Standardverfahren dar (Bustin 2002; Smith & Osborn 2009).

Als Housekeepinggen wurde in dieser Arbeit beta-Actin verwendet. Die mRNA von beta-Actin wird in allen Zellen auf einem mittleren Niveau exprimiert und kodiert für ein ubiquitäres Zytoskelettprotein. Diese mRNA wurde als eine der ersten als interner Standard in der quantitativen PCR eingesetzt und gilt immer noch als Standard (Bustin 2000; Bär et al. 2009). Allerdings liegen auch Erkenntnisse vor, dass die Expression von beta-Actin nach biochemischer Stimulation variieren kann (Ruan & Lai 2007). Vor allem bei der Untersuchung von Keratinozyten scheint aber beta-Actin bisweilen das anerkannteste Housekeepinggen zu sein (Bär et al. 2009).

Um eventuellen Messfehlern vorzubeugen, wurden von jeder in dieser Arbeit dargestellten qPCR-Analysen drei Versuchsläufe durchgeführt und daraus der Mittelwert gebildet.

4.1.2 Angewandte Methodik zur Analyse der Proteinexpression von HECA

Der Nachweis des HECA-Proteins erfolgte mittels Immunoblot. Der Immunoblot gilt als sensitive Methode zur Detektion und Charakterisierung von Proteinen. Dies erfolgt prinzipiell durch eine Antigen-Antikörperreaktion (Gallagher & Chakavarti 2008).

Die Proteinlösungen wurden nach einem Standardprotokoll mittels RIPA-Puffer aus den gezüchteten Zelllinien hergestellt. RIPA-Puffer gilt als die gebräuchlichste und vielfältigste Pufferlösung im Bereich der Immunopräzipitation. Dieser Puffer wird meist verwendet, wenn über das Lösungsverhalten des untersuchten Proteins wenig bekannt ist, was auch im Fall von HECA zutrifft (Dickson 2008).

Die Auftrennung der Proteine erfolgte basierend auf dem Protokoll von Laemmli (Laemmli 1970) in einem 10 %igem SDS-Polyacrylamidtrenngel, das für den Nachweis von Proteinen mit einem Molekulargewicht zwischen 20 kDa und 80 kDa ideal ist (Sambrook & Russel 2001). Die in dieser Arbeit detektierten Proteinvarianten haben ein Molekulargewicht zwischen 33 kDa und 63 kDa.

Die im SDS-Gel aufgetrennten Proteine wurden in einem elektrophoretischen Verfahren auf die PVDF-Membran transferiert (hier: Wet Blotting). Die Vorteile dieses Vorgehens liegen in der Schnelligkeit und der Vollständigkeit der Übertragung, weshalb dieses Verfahren auch das gebräuchlichste darstellt (Kurien & Scofield 2003).

Als Readout für den experimentellen Nachweis des HECA-Proteins wurde die Detektion eines chemolumineszenten Signals verwendet. Durch die Zugabe von Luminol wird dieses Signal an der Bindestelle des Sekundärantikörpers durch das Enzym Meerrettich-Peroxidase emittiert. Durch dieses Verfahren können bereits kleinste Proteinmengen von sogar weniger als 1 pg detektiert werden, weshalb es sich auch besonders für den Nachweis des HECA-Proteins eignet (Kurien & Scofield 2003).

Weiterhin erfolgte eine relative Quantifizierung der Expression des HECA-Proteins in den einzelnen Zelllinien. Diese Methode wird nach chemolumineszenter Detektion in Immunoblots routinemäßig eingesetzt, um quantitative Veränderungen der Proteinexpression in Zellen oder Gewebeextrakten zu ermitteln (Charette et al. 2010). Auch hier erfolgt die Quantifizierung relativ zu einem Housekeepinggen. Auf die Zuverlässigkeit des hier verwendeten beta-Actin wurde bereits näher eingegangen (Bär et al. 2009).

Um die Verteilung des HECA-Proteins in den einzelnen Zellkompartimenten untersuchen zu können, wurden subzelluläre Fraktionen mit dem Subcellular Proteome Extraction Kit von Calbiochem erstellt. Die hier verwendete Methode zur Fraktionierung des Proteoms durch einzelne Zentrifugationsschritte wird zu den klassischen Techniken gezählt (Lee et al. 2010). Durch die Auftrennung des Proteoms in subzelluläre Fraktionen können präzisere Aussagen über die Verteilung und die Funktion des untersuchten Proteins in der Zelle gemacht werden (Gauthier & Lazure 2008). Auch bei HECA konnten so anhand von Immunoblots mit dem Proteom der einzelnen Zellkompartimente Unterschiede in der Verteilung der einzelnen Proteinvarianten erkannt werden. Die hier angewandte Kombination von fraktioniertem Proteom mit einer anschließenden Gelanalyse gilt als anerkanntes Verfahren. Zusätzlich könnten die detektierten Proteine noch massenspektrometrisch detaillierter analysiert werden (Yates et al. 2005; Huber et al. 2003).

Weiterhin können durch eine Fraktionierung des Proteoms auch Proteinvarianten erkannt werden, die aufgrund ihrer geringeren Konzentration im gesamten Proteom der Zelle nur in den einzelnen Zellkompartimenten detektiert werden können (Cox & Emili 2006). So konnte z.B. im Zytosol die 33 kDa-Variante auch in den Zelllinien HOK, PCI 1, PCI 13 und PCI 68 nachgewiesen werden, wohingegen diese Variante in den Ganzzelllysaten nur bei PCI 4 erkennbar ist (**Abb. 2, 3, 4 und 6, Bande e**).

Ein gebräuchliches Verfahren zur Identifikation von posttranslationalen Modifikationen besteht beispielsweise in der Isolierung von glykosylierten und phosphorylierten Proteinen und einer anschließenden Analyse dieser Proteine mittels Massenspektrometrie (Bond & Kohler 2007; Mann & Jensen 2003). In dieser Arbeit sollte aber ein spezifisches Protein auf posttranslationale Modifikationen untersucht werden. Dazu wurde durch einen Enzymmix (Protein Deglycosylation Mix von NEB) das Proteom der untersuchten Zelllinien verdaut. Anschließend erfolgte durch einen Vergleich zwischen behandelter und unbehandelter Proteinlösung im Immunoblot eine Analyse, ob glykosylierte HECA-Proteinvarianten vorhanden sind (**Abb. 10 und 11**). Es wird angenommen, dass die 40 kDa- (**Abb. 10 und 11, Bande b**) und die 47 kDa-Variante (**Abb. 10 und 11, Bande c**) des HECA-Proteins glykosyliert vorliegen. Ein experimenteller Beweis könnte noch mittels einer massenspektrometrischen Analyse dieser beiden Varianten erbracht werden (Larsen et al. 2005).

Für den Nachweis einer Phosphorylierung des HECA-Proteins wurde analog vorgegangen. Dabei erfolgte die Analyse von putativen phosphorylierten HECA-Proteinvarianten mittels Lambda Protein Phosphatase von NEB. Mit dem in dieser Arbeit angewandten Versuchsdesign konnte keine Phosphorylierung gezeigt werden. Dies wird in Punkt 4.3 noch näher erläutert.

4.2 Nachweis unterschiedlicher HECA-Proteinvarianten

Die vorliegende Arbeit liefert neue Erkenntnisse bezüglich der Charakterisierung von humanem *headcase* und seiner Isoformen in humanen oralen Keratinozyten und im oralen Plattenepithelkarzinom. Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene HECA-Proteinvarianten in oralen Keratinozyten existieren. Dies wurde anhand von Immunoblots mit zwei verschiedenen Antikörpern nachgewiesen. Vergleicht man die Ergebnisse aus den Versuchen mit den beiden Antikörpern, so ist ersichtlich, dass vor allem drei unterschiedliche Hauptvarianten des HECA-Proteins zu existieren scheinen: Dies ist eine Variante mit 59 kDa (z.B. **Abb.2, Bande a**), eine mit 47 kDa (z.B. **Abb.2, Bande c**) und eine mit 40 kDa (z.B. **Abb.2, Bande b**). Mit dem Antikörper von Abnova werden dabei nur die Varianten mit dem Molekulargewicht von 59 kDa und 40 kDa detektiert, die wahrscheinlich die beiden Hauptvarianten darstellen. Auffällig dabei ist, dass sich in den einzelnen untersuchten Zelllinien das Verhältnis dieser beiden Varianten stark unterscheidet. So kann in HOK mit dem Antikörper von Abnova fast nur die 40 kDa-Variante nachgewiesen werden, wohingegen in den Tumorzelllinien PCI 52 und PCI 68 überwiegend das Volllängeprotein mit 59 kDa vorhanden ist. In den anderen Zelllinien (PCI 1, PCI 4A und PCI 13) herrscht ein annähernd ausgewogenes Verhältnis dieser beiden Varianten.

Weiterhin konnte bei Versuchen mit dem HECA-Ak von Santa Cruz eine überwiegend in HOK auftretende Proteinvariante von 47 kDa detektiert werden. Diese konnte in den Tumorzelllinien zwar auch gefunden werden, allerdings in einem geringeren Ausmaß. Weiterhin wurden mit diesem Antikörper noch weitere Varianten erkannt, auf die aber erst im Folgenden eingegangen werden soll.

Vergleicht man diese Ergebnisse mit früheren Untersuchungen, so zeigt sich in dieser Arbeit eine größere Anzahl an Proteinvarianten. So konnte beispielsweise in HOK bisher nur die 59 kDa-Variante detektiert werden (Dowejko et al. 2009). Dies könnte durch eine

Protokolloptimierung und eine bessere Chargenqualität der Antikörperhersteller (Abnova) erklärt werden.

Setzt man zu den gerade beschriebenen drei Proteinvarianten die untersuchten mRNA-Transkripte in Bezug, so stellt sich heraus, dass die Expression dieser Transkripte mit den hier detektierten Proteinvarianten korreliert. Das mit den Primerpaaren HECA T2a und HECA T2b nachgewiesene Volllängetranskript könnte somit die Vorlage für die Produktion des 59 kDa-Proteins sein. Die Spleißvariante II, detektiert durch das Primerpaar HECA Ex3aI, kodiert vermutlich für die kurze Peptidvariante mit 40 kDa. Berechnet man das Molekulargewicht des von EC-Gene angegebenen Proteins mit Expasy ProtParam, so ergibt sich ein Molekulargewicht von 42,73 kDa, was somit der Größe im Westernblotnachweis in etwa entspricht. Die Translation der vor allem bei HOK auftretenden Proteinvariante von 47 kDa müsste auf Grundlage des von Ace View angegebenen mRNA-Transkript erfolgen. Dieses unterscheidet sich nur in der Anfangssequenz von der Spleißvariante II und wird somit auch durch das Primerpaar HECA Ex3aI erfasst.

Die in dieser Arbeit zusätzlich detektierten Proteinvarianten werden auf die Wirkung von posttranslationalen Modifikationen (PTMs) zurückgeführt, die nicht auf Genebene kodiert werden und somit nicht durch die Analyse von mRNA-Transkripten nachgewiesen werden können. Sie wirken, wie einleitend dargestellt, vor allem auf die Regulation der Proteinfunktion ein (Temporini et al. 2008).

Von *Drosophila headcase* ist bekannt, dass auch dort zwei unterschiedliche Proteinvarianten existieren. Hier liegt die kleinere 70 kDa-Variante viermal so häufig vor wie die größere 125 kDa-Variante. Jedoch kann nur die Letztgenannte ihre Funktion als Inhibitor für weitere Verzweigungen des Tracheensystems ausüben. Diese beiden Proteine werden in *Drosophila* nach einem neuartigen Mechanismus erstellt. Durch das Überlesen eines internen Stopkodons auf der mRNA kommt es zur Ausbildung zweier unterschiedlich großer Proteine (Steneberg et al. 1999; Steneberg & Samakovlis 2001). Dieser Mechanismus könnte künftig ein Untersuchungsmodell für das humane *HECA* darstellen, um die Bedeutung der *HECA*-Varianten in gesundem und malignem oralen Epithel zu analysieren.

4.3 Expression des HECA-Proteins in den einzelnen subzellulären Fraktionen

Es ist bekannt, dass der Anteil an PTMs *in vivo* nur ca. 1 % beträgt (Seo & Lee, 2004). Zudem sind derart modifizierte Proteine auf einzelne Zellkompartimente beschränkt. Liegen diese Proteinvarianten nun in geringen Konzentrationen in den einzelnen Kompartimenten vor, so können sie unter Umständen nur detektiert werden, wenn sie in subzellulären Fraktionen untersucht werden (Jensen et al., 2006).

Betrachtet man nun die Verteilung des HECA-Proteins in den einzelnen subzellulären Fraktionen, so können in den einzelnen Zellkompartimenten der untersuchten Zelllinien unterschiedliche Varianten dieses Proteins detektiert werden (**Abb. 3 – 6**).

Es konnte gezeigt werden, dass das HECA-Protein im Nukleus vorhanden ist. Bei HOK und PCI 68 dominiert die 40 kDa-Variante in der Kernfraktion. In PCI 1 und PCI 13 liegen das HECA-Volllängeprotein und die 40 kDa-Variante in etwa gleichen Anteilen vor. Bei PCI 52 tritt nur das HECA-Volllängeprotein auf, wohingegen die 40 kDa-Form fast vollständig fehlt.

Im Zytosol, im Nukleus und an Membran bzw. in Organellen von HOK und PCI 13 befindet sich hauptsächlich die 40 kDa-Variante, während das Volllängeprotein mit 59 kDa fast ausschließlich am Zytoskelett und in geringen Anteilen auch im Nukleus vorhanden ist (**Abb. 3, Bande a und b**).

Mittels der Deglykosylierungsversuche konnte gezeigt werden, dass die 40 kDa-Form vermutlich glykosyliert vorliegt (**Abb. 10 und 11, Bande b**), da nach der Deglykosylierung eine zuvor nicht existente ca. 33 kDa-Variante (**Abb. 10 und 11, Bande e**) erscheint.

Die 40 kDa-Variante tritt weiterhin stark im Zytosol, Nukleus und Zytoskelett von PCI 1 und PCI 68 auf (**Abb. 4 und 6, Bande b**). Auffällig ist dabei, dass diese HECA-Variante zwar in Zytosol und an Membran und Organellen in der entdifferenzierten Zelllinie PCI 52 auftritt, aber fast gar nicht im Nukleus (**Abb. 5, Bande b**). Man könnte daher vermuten, dass die 40 kDa-Variante als glykosylierte und funktionelle Form aus dem Zytosol und/oder den Zellorganellen in den Zellkern transferiert wird und dort seine Wirkung als Zellzyklusregulator ausübt, indem es die Expression bzw. Funktion von Zellzyklus-relevanten Proteinen beeinflusst. In der entdifferenzierten Zelllinie PCI 52 Zellen könnte die fehlende Zellzykluskontrolle u.a. durch das Fehlen des nukleären, glykosylierten 40 kDa-HECA-Proteins verursacht werden.

Das 59 kDa Volllänge-HECA-Protein konnte hauptsächlich in der Zytoskelett-Fraktion aller untersuchten Zelllinien nachgewiesen werden. Angesichts des inhibierenden Einflusses von HECA auf den Zellzyklus (Doweiko et al. 2009) könnte das Volllänge-HECA mit Checkpoint-

Proteinen interagieren, welche Einfluss auf Kinetochore ausüben. Kinetochore vermitteln die Bindung von Mikrotubuli der Spindel an die Chromosomen während der Zellteilung (Musacchio & Salmon, 2007).

Interessanterweise interagiert das *Drosophila headcase* mit Bub1-like Protein, d.h. einem Zellzyklus-Checkpointprotein, das wichtig ist bei der Spindelassemblierung (Giot et al. 2003).

Ferner stellten Mukherji et al. (2006) in einem RNAi screen an der Osteosarkomzelllinie U2OS fest, dass nach *HECA*-Silencing die Zellen einen signifikant vergrößerten Nukleus aufwiesen und *HECA* somit zu den krebsrelevanten Zellzyklusregulatoren gezählt wird.

Die vermutlich glykosylierte 47 kDa *HECA*-Variante tritt besonders deutlich in den Ganzzelllysaten (**Abb. 2 und 9, Bande c**) und der Zytoskelettfraktion (**Abb. 3, Bande c**) auf. Ferner nimmt ihre Expression während der Zelldifferenzierung zu (**Abb. 9, Bande c; Grafik 8**). Daher ist anzunehmen, dass die 47 kDa-Variante notwendig ist zur Aufrechterhaltung der Zellfunktion (Differenzierung und/oder Zellteilung).

Eine weitere Auffälligkeit der Immunoblotanalyse ist eine ca. 63 kDa große Bande (**Abb. 2 – 6, Bande f**) in der nukleären Fraktion und in den Ganzzelllysaten aller untersuchten Zelllinien außer PCI 15 und PCI 52. Da das Volllänge *HECA*-Protein eine Größe von 59 kDa aufweist, scheint die 63 kDa-Form das Resultat einer posttranslationalen Modifikation zu sein. In der Tat gibt es Hinweise, dass *HECA* ein ca. 45 AS langes N-terminales Signalpeptid besitzt, welches ca. 5 kDa groß wäre und somit in etwa der Differenz zwischen den beiden Varianten (Volllänge und 63 kDa-Variante) entsprechen würde (Human Protein Atlas 2010: http://www.proteinatlas.org/gene_info.php?ensembl_gene_id=ENSG00000112406). Ein N-terminales Signalpeptid markiert ein Protein für den Transport ins endoplasmatische Retikulum. Von dort kann es entweder an seinen Bestimmungsort innerhalb der Zelle transportiert oder über den Golgiapparat und Vesikel für den Export vorbereitet werden, u. a. durch Anheften von Glykosylresten (Hiss & Schneider, 2009).

Bemerkenswert ist, dass in dieser Arbeit glykosylierte *HECA*-Peptidvarianten nachgewiesen wurden, wobei in der subzellulären Fraktion von Membran und Organellen fast ausschließlich die 40 kDa-Variante detektiert wird.

Eine weitere posttranslationale Modifikation, die sich als zusätzliche Bande im Immunoblot niederschlagen würde, ist die Phosphorylierung. Dephore et al. (2008) untersuchten die *in vivo* Phosphorylierung von Proteinen der humanen Cervixkarzinomzellen HeLa in Abhängigkeit vom Zellzyklus und stellten u. a. fest, dass das *HECA*-Protein in der G₁-Phase an 3 verschiedenen Aminosäuren phosphoryliert vorliegt. Die Autoren gehen davon aus, dass eine

multiple Phosphorylierung die Konformation, Interaktion und Stabilität eines Proteins verändern kann.

Da *HECA* offenbar erst in der G₂/M-Phase funktional ist und vermutlich dephosphoryliert vorliegt, könnte *HECA* in der G₁-Phase durch multiple Phosphorylierung destabilisiert werden, ähnlich wie β -Catenin durch Phosphorylierung für den Abbau im Proteosom markiert wird (MacDonald et al., 2009). *HECA* würde demnach also durch Dephosphorylierung aktiviert.

In dieser Arbeit konnte eine Phosphorylierung von *HECA* nicht nachgewiesen werden (**Abb. 12**). Folgende Gründe können hierfür diskutiert werden: Es ist bekannt, dass der *in vivo* Anteil von phosphorylierten Proteinen in einer Zelle unter 0,1% liegt und die Umsatzrate dieser Modifikation sehr schnell ist (Seo & Lee, 2004). Um eine höhere Konzentration an Phospho-*HECA* zu erreichen (über die Nachweisgrenze im Immunoblot), müssten Lysate von Zellen verwendet werden, die in der G₁-Phase arretiert werden, z. B. durch Serumentzug über Nacht.

Falls die Hypothese stimmt, dass Phospho-*HECA* degradiert wird, dann wäre es aufgrund seiner kürzeren Halbwertszeit nur schwer in einem Dephosphorylierungsassay und anschließendem Immunoblot mit den gegenwärtigen kommerziell erhältlichen Antikörpern nachzuweisen. Eine bessere Detektion könnte mit eigens hergestellten monoklonalen Antikörpern gegen Phospho-*HECA* erreicht werden.

Es kann ferner vermutet werden, dass die 33 kDa-Variante eine nicht mehr funktionsfähige Variante des *HECA*-Proteins darstellt. Diese Variante kann in den Ganzzelllysaten nur in der entdifferenzierten Zelllinie PCI 4A detektiert werden (**Abb. 2, Bande e**). In den untersuchten subzellulären Fraktionen tritt diese deglykosylierte 33 kDa-Variante mit Ausnahme von PCI 52 im Zytosol auf (**Abb. 3 -6, Bande e**). Fehler in der Glykosylierung von Proteinen können zu einer reduzierten Aktivität dieser fehlerhaften Proteine führen (Brooks 2006). Defekte Proteine werden ins Zytosol transportiert, wo sie dann abgebaut werden (Herbert et al., 2007). Durch Anhängen von Ubiquitin werden diese defekten Proteine für den Abbau im Proteasom markiert (Trombetta & Parodi 2003). Es existieren komplexe Signalwege vom endoplasmatischen Retikulum ins Zytosol und in den Zellkern, um auf defekte Proteine reagieren zu können. Diese Signalwege sind für die zelluläre Homeostase wichtig und spielen mutmaßlich Schlüsselrollen bei der Pathogenese vieler Krankheiten wie Krebs, Diabetes Mellitus oder viralen Infektionen (Lin et al., 2008).

Die Vermutung, dass es sich um ein nicht funktionsfähiges Protein handelt, kann auch für die 45 kDa-Variante angestellt werden, die bei der ebenso entdifferenzierten Zelllinie PCI 52 in den Ganzzelllysaten auftritt (**Abb. 2, Bande d**). Dies ist ebenso eine deglykosylierte Variante und

tritt gleichfalls nur im Zytosol auf (**Abb. 7, Bande d**). Sie kann zusätzlich auch in der zytosolischen Fraktion von PCI 68 gefunden werden (**Abb. 8, Bande d**).

4.4 HECA als Tumorsuppressor

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression von *HECA* abhängig ist von der Zelldifferenzierung. So konnte bei HOK-Zellen nach einer CaCl_2 induzierten Differenzierung eine verstärkte Expression der *HECA*-Proteinvarianten beobachtet werden (**Abb. 8 und 9, Grafik 8**). Auch in den Tumorzelllinien PCI 13 und PCI 52 konnte mit zunehmender Konfluenz, was mit einer abnehmenden Mitoserate einhergeht, eine gesteigerte Expression der *HECA*-Proteinvarianten detektiert werden (**Abb. 7, Grafik 7**).

Diese Ergebnisse stimmen mit den bisherigen Daten überein, welche eine inhibitorische Aktivität von *HECA* auf die Zellteilungsrate zeigen (Dowejko et al., 2009). So wurde beobachtet, dass S-Phase synchronisierte OSCC-Zellen mehr *HECA*-mRNA und -Protein exprimieren als diejenigen in der G_0/G_1 -Phase. Weiterhin verringerte sich die Verdopplungsrate der Zellen nach einer Überexpression von *HECA* in der OSCC-Zelllinie und mehr Zellen arretierten in der G_2/M -Phase des Zellzyklus (Dowejko et al., 2009).

Dieser Befund zeigt sich auch auf Transkriptionsebene. Die Expression der Transkripte für das Volllänge-*HECA* (Primer *HECA* Ex 3-4, T2a, T2b) und die Spleißvariante I (Primer *HECA* T3) war in den Zelllinien HOK, PCI 1, PCI 9, PCI 13 und PCI 68 höher als in PCI 4A, PCI 15 und PCI 52. Interessanterweise konnten Bauer et al. (2008) anhand der Expression bestimmter Zytokeratine zeigen, dass die Tumorzelllinien PCI 1, PCI 13 und PCI 68 noch zur Differenzierung fähig sind, während die Zelllinien PCI 4A und PCI 52 sich in einem dedifferenzierten Stadium befinden.

Bei der quantitativen Analyse der *HECA*-Expression der Spleißvariante II weichen die Ergebnisse von dem zuvor dargestellten Muster ab. Auffällig ist vor allem die starke *HECA*-Expression von PCI 4A. Auf Grundlage dieses Transkripts wird auch ein Protein produziert, welches im Immunoblot als starke Detektion des 40 kDa-Peptids bei PCI 4A mit dem Antikörper von Abnova sichtbar wird (**Abb. 1**).

Vom kolorektalen Karzinom ist bereits bekannt, dass die mRNA-Expression von *HECA* je nach Stadium des Karzinoms variiert. Bei gesunden Patienten befindet sich eine niedrige Konzentration von *HECA* in Proben von Fäzes und Blut. Bei einem kolorektalen Karzinom im

Anfangsstadium steigt die Konzentration der *HECA*-mRNA signifikant an, wohingegen sie bei weiterem Fortschreiten des Karzinoms wieder abfällt. Diese Daten könnten zu einer Verwendung von *HECA* als Tumormarker für das Erkennen eines sich im Anfangsstadium befindenden kolorektalen Karzinoms führen (Chien et al., 2006).

Zudem ist bekannt, dass es in Zelllinien des Nierenzellkarzinoms als auch des Pankreaskarzinoms zu einer verringerten Expression der *HECA*-mRNA kommt (Makino et al., 2001).

Vergleicht man diese Daten mit den Ergebnissen aus dieser Arbeit, so werden Gemeinsamkeiten deutlich:

In der Gruppe der differenzierungsfähigen Tumorzelllinien PCI 1, PCI 13 und PCI 68 kann stets eine höhere Konzentration der *HECA*-mRNA gefunden werden. Bei den gesunden fetalen oralen Keratinozyten herrscht ebenso eine höhere Konzentration vor.

Bei den entdifferenzierten Zelllinien PCI 4A und PCI 52 liegt eine stark erniedrigte mRNA-Expression von *HECA* für das Volllängetranskript vor. Diese Ergebnisse korrelieren also mit denjenigen beim Nieren-, Pankreas- und Kolonkarzinom, bei denen eine verringerte Expression der *HECA*-mRNA gefunden wurde.

Diese Daten bestätigen die Ergebnisse von Dowejko et al. (2009): *HECA* ist in Tumorzelllinien geringer exprimiert, was zu defekter Proliferationskontrolle und/oder Differenzierung der Zellen führt.

Neue Daten (Dowejko, unpublizierte Daten) zeigen ferner einen Link zwischen dem Wnt/ β -Catenin-Signalweg und *HECA* (Tang et al. 2008), sodass ein in Tumorzellen konstitutiv aktiviertes Wnt zu geringerer *HECA*-Expression und damit zu vermehrter Proliferation führt.

Um präzisere Aussagen bezüglich der mRNA-Expression von *HECA* in den einzelnen Tumorstadien beim oralen Plattenepithelkarzinom treffen zu können, sind weitere Untersuchungen notwendig, die auf direkt am Patienten gewonnenem Material basieren müssen, worauf in Punkt 4.5 näher eingegangen wird.

4.5 HECA als Prognoseparameter

Aufgrund der bereits publizierten Ergebnisse und der in dieser Arbeit gewonnenen Daten kann gefolgert werden, dass die Expression von *HECA* (sowohl der Volllänge als auch seiner Varianten) prediktives Potential hinsichtlich eines Plattenepithelkarzinoms in der Mundhöhle besitzt.

Folgende Argumente können aufgeführt werden:

1. *HECA* exprimiert im oralen Plattenepithelkarzinom (Dowejko et al. 2009) und in Metastasen (Dowejko, unpublizierte Daten) schwächer als in gesunder Mundschleimhaut. Die Expression ist abhängig vom Differenzierungsstatus der OSCC-Zelle, wie *in vitro* an Zelllinien gezeigt wurde (**Abb. 7, 8 und 9, Grafiken 7 und 8**).
2. *HECA* besitzt nachweislich mindestens 3 Peptidvarianten, welche differentiell in den unterschiedlichen Zelllinien (HOK und Tumorzelllinien) und in den subzellulären Kompartimenten exprimiert werden (**Abb. 2 – 6**). So tritt nur in HOK die 47 kDa-Variante (**Abb. 2 und 3, Bande c**) besonders prominent hervor, während die 33 kDa- und die 45 kDa-Form (**Abb. 2, Bande d und e**) in Ganzzelllysaten nur in den entdifferenzierten Zelllinien PCI 4 und PCI 52 detektiert werden, welche dort offenbar deglykosyliert vorkommen.
3. Wie einleitend erwähnt wurde *HECA* bereits als ein effektiver Marker für die Diskriminierung von frühen und späten Stadien des kolorektalen Karzinoms beschrieben (Chien et al., 2006).

In weiterführenden Untersuchungen muss gezeigt werden, ob bzw. welche *HECA*-Varianten *in vivo* im Tumorgewebe bzw. in gesunder Mukosa vorkommen. Ein möglicher Ansatz wäre eine retrospektive Studie mit Patientenmaterial, an dem die Expression der betreffenden *HECA*-Proteinvarianten mit der Malignität, dem Tumorgrading, der Inzidenz von Metastasen und dem Überleben korreliert werden könnte.

Für den physikalischen Nachweis der putativen Spleißvarianten von *HECA* im oralen Tumor könnte eine quantitative *in situ*-Hybridisierung am Gewebe aus unterschiedlichen OSCC-Stadien (Hyperplasie, Dysplasie, Cis, invasives Karzinom, Metastasen) durchgeführt werden.

Veränderungen im Glykosylierungsmechanismus von Proteinen sind in Karzinomen bekannt und diese werden auch als Biomarker diskutiert (Reis et al. 2010, Peracaula et al. 2008, Zhao J et al. 2008). Vor allem Modifikationen von N-Glykanen, denen eine wichtige Funktion bei der Adhäsion von Zellen zugeschrieben wird, werden unter anderem für die Invasion und

Metastasierung von Tumoren verantwortlich gemacht (Zhao YY et al. 2008), was wiederum im Einklang mit den Eigenschaften der Zelllinien PCI 4A und PCI 52 wäre.

Auch das Spleißverhalten von Genen ist in Krebsstadien oft signifikant verändert. In Tumorgewebe werden andere alternative Spleißformen exprimiert als in gesundem Gewebe (Körner et al. 2009), weshalb diese alternativen Spleißprodukte folglich auch als Biomarker zur Diagnose eines Karzinoms verwendet werden können (Brinkmann 2004). Beispielshalber sei hier das veränderte Spleißverhalten von p63, einem Homolog des Tumorsuppressors p53, in HNSCC (Boldrup et al. 2007) und der Onkogene MDM 2 und MDM 4 in Tumoren erwähnt (Jeyaraj et al. 2009).

Ein entsprechend verändertes Spleißverhalten von *HECA* könnte auch prognostische Aussagekraft bei neoplastischen Veränderungen des oralen Plattenepithelkarzinoms besitzen.

5 Zusammenfassung

HECA wird zu einer neuen Gruppe von Zellzyklusregulatoren gerechnet und mit der Entstehung von Karzinomen in Verbindung gebracht. Auf der Grundlage von bioinformatischen Datenbankeinträgen wurde *HECA* zusammen mit seinen Isoformen auf Transkriptions- und Proteinebene im oralen Plattenepithelkarzinom näher charakterisiert.

In Immunoblots konnte der Nachweis mehrerer unterschiedlicher *HECA*-Proteinvarianten erbracht werden. Als Hauptvarianten werden dabei die Proteine mit einem Molekulargewicht von 40 kDa, 47 kDa und 59 kDa betrachtet. In den entdifferenzierten Zelllinien PCI 4A und PCI 52 konnten in den Ganzzelllysaten weitere deglykosyliert vorliegende Proteinvarianten von 33 kDa und 45 kDa detektiert werden. Das Auftreten einer dieser beiden Varianten könnte für eine starke Entdifferenzierung eines Tumors stehen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass *HECA* mit zunehmender Differenzierung vermehrt exprimiert wird.

Ferner konnte dargestellt werden, dass die 40 kDa-Variante sowie die 47 kDa-Variante vermutlich in einem glykosylierten Zustand vorliegt. Eine Phosphorylierung des *HECA*-Proteins konnte in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden, wird aber weiterhin vermutet.

Bei den Untersuchungen der einzelnen subzellulären Fraktionen konnten Unterschiede in der Expression des *HECA*-Proteins festgestellt werden. Im Nukleus dominiert in den oralen Keratinozyten die 40 kDa-Proteinvariante gegenüber der 59 kDa-Variante. Mit zunehmender Entdifferenzierung der untersuchten Zelllinien wird vermehrt das Volllänge-Protein detektiert. Daher wird vermutet, dass es sich bei der 40 kDa-Variante im Nukleus um die funktionelle Variante des *HECA*-Proteins handelt.

Das Volllänge-Protein wird dagegen überwiegend im Zytoskelett aufgefunden. Es wird eine Interaktion mit Checkpoint-Proteinen bei der Zellteilung angenommen.

Auf mRNA-Ebene konnten die von den Datenbanken vermuteten Transkripte *in vitro* nachgewiesen werden. Es existieren somit mindestens drei verschiedene Spleißvarianten: ein Volllängetranskript sowie die vermuteten Spleißvarianten I und II. Ferner bestätigten sich die von anderen Karzinomen bekannten Ergebnisse: Mit zunehmender Entdifferenzierung der Zelllinien nimmt die mRNA-Expression von *HECA* ab.

Um *HECA* allerdings als Prognoseparameter beim oralen Plattenepithelkarzinom etablieren zu können, müssen die auf Zelllinien basierenden Ergebnisse auch *in vivo* an Patientenproben bestätigt werden. Die Aussichten hierfür sind allerdings vielversprechend.

6 Anhang

Folgende Abbildung zeigt die vollständige Nukleotidsequenz von *HECA*, einschließlich kodierender und nicht kodierender Sequenz (gelb eingefärbt). Eingezeichnet sind auch die Primerpaare HECA T2a, HECA T2b und HECA T3 und HECA Ex 3-4:

```

GCCTTTTCCCTCCGGCTCGGGAGCGTCTCGCTTGCGCCCCGGGCGCGCGCGCGCG
GCTGCGAGCCTCGGGTGCGCGCTGCCGGCTCCAGGAAGCCGGAGAGGGCGCGCGGCCA
GGATGGCGCGGCACGGGCGCTGCGGCTAGACGGGAGCCGAGGGAACCGCGGCTCGCGCC
CTCCGTTCTTTCCCGGAGCCGGCTTACGCGAGGGCCGGGAACGGCCGTGCCTCTGGGATC
CGCCTTCGCTGACGCGCGGCACCTACCTGGACGCGAGCGAGCGAGATGCCCAACCCCAAA
AACAGCAAAGGCGGCGCAAAAACAAGCGGCCAACAGCAGCGCGACGAGCAGGAAAAT
GGAGCCGGGGCCCTGGCAGCGCGGGCGCGCGCGGAGCGCGCGCGGGGGGCCCTGGCG
GCGGCGGCCGTTGCGGGGCGCGCGCGCGCGGGCGCGCGGGCGCGGAGGCGCGCGGGC
GCGGAGGCGCGGGGACTGGCGCGCGCGAACGCTGCGGCGCGCGCGGGGCTGCGGCGCG
GGCGATGCCAAAAACGAAGCCCCATGTGCCACTCCCCTGATCTGCAGCTTCGGTAGGCCG
GTGGACCTGGAGAGGAGCACTACCAGAAGGTGGTGTGCAACACGAGCACTGCCCTGC
AGCACCTGGATGCACCTGCAGTGCTTCTACGAGTGGGAGAGCAGCATCCTCGTCCAGTTC
AACTGCATCGGCGCGCGCGCGAGCTGGAACGAGAAGCAATGCCGCGAGAACATGTGGACA
AAGAAGGGCTACGACCTGGCCTTCCGCTTCTGCTCTTGCCGCTGTGGCCAGGGCCACTTG
AAGAAGGACACAGACTGGTATCAGGTGAAGCGGATGCAGGACGAGAAAAAGAAGTCT
GGCTCCGAGAAGAACACAGGGAGGCCTCCTGGTGAGGCGGCGGAGGAGCAAAAAAGTGC
AGGCCCCCAATAAGCCCCAGAAAGGCCAAGCCACGACCTCCCCCGCGGCATTCATG
GACCGGCAGAACTCCAGGAGAAGGCAGTGGGTGCCGAGCCTACGGTGCCCGTCCCCC
GGTGGCTCCCGGGCCAGTCCCCACCCACGGGCTACTCCATCCTCTCTCTGCCACTTC
AGCGGCCCCCGCTCCTCCAGATACCTCGGGGAGTTCTTAAAGAACGCCATCCATCTGGAG
CCTCACAGAAGGGCACTGGCTGGGGCCATGTGTTCAAGAAATGCCACTTTGATTACAGC
CCTGCGGGGTGGCAGTTTACAGGGGGGACACTTCGACACCCCCGTGCAGTTCTCTCGG
CGGCTGCACTCTCCGAAGCTCTCACTACATCCCCAGGCATAAGCTGAACACTTCCAC
GTGCGCATGGAAGACGATGCCCAAGTGCGCCAGGGGAAGACTTGCGGAAGTTCATTCTG
GCGCGCTCAGTGCCAGCCACAGAAACGTGGTAAACTGTGCCCTGTGCCACCGGCGCTC
CCGGTGTTCGAACAGTTCCCACTGGTGGATGGAACTTTGTTCCTAAGCCCGTCGAGACAT
GATGAGATCGAATATGATGTTCTTGTACCTCAAGGGAGACTCATGCACTGTATGCC
GTGTGCGTGGACTGCCTGGAAGGGGTTCAAGATCATCTGCATCAAGTGAAGTCACGG
TGGGATGGCAGCTGGCAGCTGCTGGGCACTATGTACACTACGACATCTGGCTGCCTCT
CCATGTTGTGTCAGGCCCGCTGAAGTGAAGCACTGTGGGAAGCCGGTGATCGACGTGAGG
ATCGGGATGCAGTACTTCTCCGAATATAGCAACGTCCAGCAGTGTCCACACTGTGGGAAC
CTGGACTACCACTTCGTGAAGCCATTTTCTCCTTCAAGTTCTCGAAGCTTATTGATGA
AAGCTTTGCTTTAGTAAATAGCTATTTTATTGATATTATTAATTTATTACATATCTTTAT
AGGGAAACATTCTGTGACATTAATTTCTTTCTAATTTAAAGGAGAGTTACTTTGTTGTA
TGTTGTGCCACTAAATAGGGGCTGCCCTTGCCCTGCTGCTTGAATTCCTGATGTTGTTG
GGTTTTGACCAGAGCCAGATGGGTAATCCTGTGCATTTGGGTTGGGGTTCACTCTTACC
AAGAATCTTTGATGAGCTGTTAAGATGTTGGGAGGATGGGGTGAATTTAGGAAAGGAAT
TTGTGGTTATAAACTAAGAGCTTGATAGGAGTTGGAAGGAACTCTTACTAAAATGTTAA
CTTTCTAAAAACCTTCTTTTAGATCTTCTTGGGCCTTTGGAAAAATATGTGACAAGTGA
ATGTAAGTCTGTGCTGGAGAGCTAATAGTGCATTAGTCTATCTCAGCCTAGTGTCTGC
AGCACACATGGGCAGGCACTTTTACTCACACTGACAGGTGACCTGAAAGTGGCACAAGTGC
TGTTTCTATCACTATTGTAATTTGCCAGTTCATTTTTCATGCTGAAAGTAATATCCAAAT
TGTAAGACATATGAAAGATATTAGTGTGCAAAATATGTTAGGTAAACTGACCTATAACA
GAATATGTGAAATGAATTTGAAATAATGCAAGAAGGCAGAACTCAATCATTTAAATTTGT
GTCTTTGAAGTTGGTAAATATAGCTTTTAAAGGAGAACCATGAATAACCTGATTTGGGCAG
TGATGATTTATTACAGGTTGCACTGTTGAAGTGTCAATTTGGTGTGAGGTTCTTCTCACAG
GTAAATCTTTTACGCCACAGAATCTAACTGGTGAGCTTCAGAACCAATAATTGCCACATT
ATTGTCTCAAAATTTGCTTATGGCCATGTATAACCAATTAATCTGAGTTTCCAAATCA
AAGATTTGACCTTAAGAGGGGAAGGGAAGGAAAGTGTGAAAGGATGATGAAGAAATAATTT
TACTATTTCTTTTAAAGTATGTTTGGAAAAATCAATGATTTTAAATGCATAGCAGTATGT
TTGAAAAATAGACCATTCTAAAAAGCCCATGATACCTTACTGTTGATGAAAAAGGATGAT
CATATATATAGAAGTTGATTAGTCAGAGCATTTGGGCATTCAAAAATACAGCCTTTGGTTC
AGTAGATTTTAAATGAGTACACTGACGTCGCATACCCCTTATAGAATTGGAATATGA
TTTCTCAAAATTAATTTGATAATTTTATGATGATGTGCATATATGCTAAAAAGAAATGCA
GAAATCATTTTATGAATAGCCAAATTTGGGGTGTGATGGAACATTTTATGTTACTCATT
TGGTTTATACTTTTCTTTTCTTTTAACTGTGTGGTTTCTTTTCTCAGAAGTATTTA
GGCAATATTGACGTGAGTTTCACTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTT
TTGTCAACCCAGGCTGGAGTTCAGTAGTGCATCTCAGTCACTGCAACCTCTGCCTCCTG
GATTCAAGCGATTCTCCTGTCCAGCCTCCAGGTAGCTGGGACTATAGGCACGTGCCAC
CACACCCGGCTAATTTTGTATTTTATGATAGACAGCGTTTACCATTGTTAGCTAGGA
TGGTCTAGATCTCCTGACCTTGTGATCTGCCTGCCTCGGCCTCCAAAGTGTGGGATTA
CAGGCGTGAGTCACTGTGCTGGCCAAAGTTTCACTTCTATATGAAGTATTTGATGTTTGT
TTTGAACAATACAGCATTAAGAACCAATGTTATTACTAATATCATTCATCTTTCACT

```

Primer T2a forward

Primer Ex 3-4

Primer T 3

Primer T2a reverse

TTGGATGATTTGGTTTGCTGCATCTAGGTTGGTGTGTTGATCATCTGAAAAACATTTTCAG
 TGGGAAGAAATGCATAAAATGCCCTATAAGAAGTAGAAAGTCATTGAACTGACAGTGTGTTG
 ATGCAACTAAAAAGAGGATTGTAAGACATAGCTTTCTGCAAACCTGTCCTTAATGCACAAA
 GCTGTAGTGGTGAATTAACATATCTCCTTATTGATTCTCTCCTGTACCCAGATGCAAAAAG
 TGCTAAGTTTCTCTTGTCTCGTAATACCATTTGGATTTTATTCTGAATTTAAATAGTA
 AAATATTTATGAT**GCTGATCTTTAACCACCC**TAAAAATTTATAGTGAAACCTGCCTTTATA
 TTGTTGTTCTGAAGCTTACAATTGACCTATACATTGCATTGAGCAAGCTCCTGAATTTAG
 AACTG**CCGTCAAGTGTAGTGTATGCT**TGTGTTCCATGTTGCCTTTTATAGATGGCTTTCTACC
 CCCTGAACAATAAATAGGATGAGGTTTTACTGTAATTGGGTAAAGTTTACTCTTGGACAT
 TATTTTCGATGCTAAAGTAAGGATTCTGTGGATGTTACTTAAAGAGAAAAGCATAAGAGCA
 TGAAGCATATCTGGGAATATCTTTTGCCCTTAAAGACGATTCATTCTTGTCTAGAGGGAAA
 ATCTGGCTGATTTGGGAATAAAATATAATCGAATATTCAACCCATGAAGATAAAATCTTA
 TTTTGGAAATCTACTGACCTTAATACCCCAAGCTTGCCCTGAATACTTTGATTGGAATTG
 GAATATATCAAAAAGGTTAGTATTTTTGTTGTAGTTAGGATACTAAAAGGATATTAGTT
 ACCCAAGAGATCCAATTTGTTTTCTGATGAATAGTGTTCAGTAAATGAAGCAGTCTTA
 AGAGTGACTAATAATTTCAAAGTGATTTTTCTGCTATTCTTAATATTTTTTAATTATTTA
 TTTTAAAGAGTTTTATACCTTGAGCAGATACAATGATCTGCTTTAGTGAGAGGACAATTT
 CTGATTGATTGTTTTCTCTTCAGGCCATCTCACCTCTTCATTCTCTTGTACATTGGAAG
 CAGTTGATATAATGGGTTTATACTTTTAAAAGATAGACATGGTGCCATGAAGTTGGGGAGT
 TGGGTGAATTATCCCATTCTAGTTACAGAGGAGCTTTCCTTAAATGCCCTTTAACTTCTA
 GGTTTTGTTCAAGAAGTTCATTTTCTGAGTAAAGGTATTTTCATATATGTTGGGGGAAA
 ATTAACCTCATCTAAAAAGAATCTTATTAGGTATTTGAACTCTAAAACCTAACAGATAAGAC
 AGATATGTACCTTATTAGAGCACCAGAACTAATTGCTAAGTCTTTTGTGTTAGTCCTGCA
 AGACTGATGCTTAATACACAGTCTGTTCTCCTGTGTCTAGGTGAGGAAGTCCAGTTTGCT
 TTTCTGTTTTGTGTCCTGGTAGCAGCTGTTGAGTAACTTTCATTGGAGGTTGGGAAGGAA
 GTGAGGAGAAAGTGTTCTTGTGTTAGTGTGTTTTATTTCCCTATAATAGGATGCTGCCTAACCC
 AGTTTCATCTCTATGTCCTGTTCACTGAATATTCCGGGTAATTGAAAGAAAATATAATGGA
 TGGGCTCCATTAAACCAGCTCAAAAATAAATTCTTGTCAGTAAAGATTCTTGTCAAGA
 TGTCTTGGATTGCACTTTTGTGAGGAAAGACAGTGTAATAGTTAAAGAATGTTGATAA
 AATTGAAACATTTGGTTGTGGAATTGTGTGTGGTTTATAGAGGGTTCTGTTTGTGAAATG
 TATGTATTAAAAATAATAAATTCCAGAACTAACATTGTA

Primer T2b forward

Primer T2b reverse

Grafik 18: Nukleotidsequenz der mRNA von HECA. Die Primerpaare HECA T2a, HECA T2b, HECA T3 und HECA Ex 3-4 sind farblich markiert.

Im Folgenden wird die 1632 Nukleotide umfassende kodierende Sequenz von Headcase dargestellt. Diese setzt sich aus vier Exons zusammen, die in der Abbildung farblich unterschieden werden können. Eingezeichnet ist auch das Primerpaar HECA Ex 3-4

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/CCDS/CcidsBrowse.cgi?REQUEST=GV&DATA=5591>).

```
ATGCCCCAACCCCAAAAACAGCAAAGGCGGCCGCAAAAACAAGCGCGCCAACAGCAGCGGGCGACGAGCAGG
AAAATGGAGCCGGGGCCCTGGCAGCGGGCGGGCGGGAGCGGCGGGCGGGGGGGCCCTGGCGGCGGC
GGCCGGTTGCGGGGCGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGAGGCGGGCGGGCGGGAGGCGCGGGG
ACTGGCGCCGCGAACGCTGCGGCCGCCGCGGGGGCTGCGGCCGCGGGCGATGCCAAAAACGAAAGCCCCAT
GTGCCACTCCCCTGATCTGCAGCTTCGGTAGGCCGGTGGACCTGGAGAAGGACGACTACCAGAAGGTGGT
GTGCAACAACGAGCACTGCCCCCTGCAGCACCTGGATGCACCTGCAGTGCTTCTACGAGTGGGAGAGCAGC
ATCCTCGTCCAGTTCAACTGCATCGGCCGCGCGCGCAGCTGGAACGAGAAGCAATGCCGCCAGAACATGT
GGACAAAGAAGGGCTACGACCTGGCCTTCCGCTTCTGCTCTTGCCGCTGTGGCCAGGGCCACTTGAAGAA
GGACACAGACTGGTATCAGGTGAAGCGGATGCAGGACGAGAAAAAGAAGAAGTCTGGCTCCGAGAAGAAC
ACAGGGAGGCCTCTTGGTGAAGCGGCGGAGGAGGCAAAAAGTGCAGGCCCCCAATAAGCCCCAGAAAG
GCCCCAAGCCACGACCTCCCCCGCGGCATTCCATGGACCGGCAGAACTCCAGGAGAAGGCAGTGGGTGC
CGCAGCCTACGGTGCCCGTTCCCCCGGTGGCTCCCCGGGCCAGTCCCCACCCACGGGCTACTCCATCCTC
TCTCCTGCCACTTCAGCGGCCCGCTCCTCCAGATACCTCGGGGAGTTCTTAAAGAAGCCATCCATC
TGGAGCCTCACAAGAAGGCCATGGCTGGGGGCCATGTGTTTCAGAAATGCCCACTTTGATTACAGCCCTGC
GGGGTTGGCAGTTCACAGGGGGGACACTTCGACACCCCGTGCAGTTCTTTCGGCGGCTGGACCTCTCC
GAACTCCTCACTCACATCCCCAGGCATAAGCTGAACACTTTCCACGTGCGCATGGAAGACGATGCCCAAG
TGGGCCAGGGGAAGACTTGCAGGAAGTTTATTCTGGCCGCGCTCAGTGCCAGCCACAGAAACGTGGTAAA
CTGTGCCCTGTGCCACCGGGCGCTCCCGGTGTTTCGAACAGTTCCCACTGGTGGATGGAACCTTTGTTCTTA
AGCCCGTCGAGACATGATGAGATCGAATATGATGTTCTTGTACCTTCAAAGGAGACTCATGCATCTGT
ATGCCGTGTGCGTGGACTGCCTGGAAGGGGTTACAAGATCATCTGCATCAAGTGTAAAGTACGGTGGGA
TGGCAGCTGGCACCAGCTGGGCACTATGTACACCTACGACATCCGCTGGCTGCCTCTCCATGTTGTCAGGCC
CGCCTGAACTGTAAGCACTGTGGGAAGCCGGTGATCGACGTGAGGATCGGGATGCAGTACTTCTCCGAAT
ATAGCAACGTCCAGCAGTGTCCACACTGTGGGAACCTGGACTACCACTTCGTGAAGCCATTTTCTCCTT
CAAAGTTCTCGAAGCTTATTGA
```

Grafik 19: Dargestellt ist die kodierende Sequenz von HECA mit 70 Zeichen pro Zeile, potentielle Spleißstellen sind grau eingefärbt. Das Primerpaar HECA Ex 3-4 ist unterstrichen.

Wird diese Sequenz translatiert, entsteht ein Protein aus 543 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 58,8 kDa und einem pH von 8,4

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/CCDS/CcidsBrowse.cgi?REQUEST=GV&DATA=5591>):

```
MPNPKNSKGRKNKRANSSGDEQENGAGALAAAGAAGAAAGGALAAAAGCGAAAAGAPGAGGAAGAGGAG
TGAANAAAAAGAAAAGDAKNAPCATPLICSFGRPVDLEKDDYQKVVCNNEHCPCSTWMHLQCFYEWESS
ILVQFNCIGRARSWNEKQCRQNMWTKKGYDLAFRCSCRCGQGHLLKDDTDWYQVKRMQDEKKKKSGSEKN
TGRPPGEAAEEAKKCRPPNKPQKGPShDLPRRHSMRQNSQEKAVGAAAYGARSPGSGPGQSPPTGYSIL
SPAHFSGPRSSRYLGEFLKNAIHLEPHKKAMAGGHVFRNAHF DYSPAGLAVHRGGHFDTPVQFLRLDL
ELLTHIPRHLNTFHVREDDAQVGQGEDLRKFILAALSASHRNVVNCALCHRALPVFEQFPLVDGTLFL
SPSRHDEIEYDVPCHLQRLMHLAYAVCDLEGVHKIICIKCKSRWDGSWHQLGTMITYDILAASPCQA
RLNCKHCGKPVIDVRIGMQYFSEYSNVQQCPHCGNLDYHFVKPFSSFKVLEAY
```

Abbildung 20: Dargestellt ist die Aminosäuresequenz nach erfolgter Translation der kodierenden Sequenz. Die von den unterschiedlichen Exons stammenden Aminosäuren können weiterhin farblich unterschieden werden. Die rot gekennzeichneten Aminosäuren kennzeichnen putative Spleißstellen.

Im Folgenden ist die Nukleotidsequenz der Spleißvariante II dargestellt. Eingezeichnet ist auch das Primerpaar HECA Ex3a1. Dieses Transkript besteht aus 1175 Basen, das translatierte Peptid aus 379 AS (ECgene 2007).

```
gtgcaacaacgagcactgccccctgcagcacctggATGCACCTGCAGTGCTTCTACGAGTGGGAGAGCAGC
ATCCTCGTCCAGTTCAACTGCATCGGCCGCGCGCGCAGCTGGAACGAGAAGCAATGCCGCCAGAACATGT
GGACAAAGAAGGGCTACGACCTGGCCTTCCGCTTCTGCTCTTGCCGCTGTGGCCAGGGCCACTTGAAGAA
GGACACAGACTGGTATCAGGTGAAGCGGATGCAGGACGAGAAAAAGAAGAAGTCTGGCTCCGAGAAGAAC
ACAGGGAGGCCTCCTGGTGAGGCGGCGGAGGAGGCAAAAAAGTGCAGGCCCCCAATAAGCCCCAGAAAG
GCCCCAAGCCACGACCTCCCCCGCCGGCATTCCATGGACCGGCAGAACTCCCAGGAGAAGGCAGTGGGTGC
CGCAGCCTACGGTGCCCGTTCCCCCGGTGGCTCCCCGGGCCAGTCCCCACCCACGGGCTACTCCATCCTC
TCTCCTGCCCCTTACGCGCCCCCGCTCCTCCAGATACCTCGGGGAGTTCTTAAAGAACGCCATCCATCT
GGAGCCTCACAAGAAGGCCATGGCTGGGGGCCATGTGTTTCAAGAAATGCCCACTTTGATTACAGCCCTGCG
GGGTTGGCAGTTCACAGGGGGGGACACTTCGACACCCCCGTGCAGTTTCTTCGGCGGCTGGACCTCTCCG
AACTCCTCACTCACATCCCCAGGCATAAGCTGAACACTTTCCACGTGCGCATGGAAGACGATGCCCAAGT
GGGCCAGGGGGAAGACTTGCGGAAGTTTATTCTGGCCGCGCTCAGTGCCAGCCACAGAAACGTGGTAAAC
TGTGCCCTGTGCCACCGGGCGCTCCCGGTGTTTGAACAGTTCCCACTGGTGGATGGAACCTTGTTCCTAA
GCCCCGTCGAGACATGATGAGATCGAATATGATGTTTCTTGTACCTTCAAGGGAGACTCATGCATCTGTA
TGCCGTGTGCGTGGACTGCCTGGAAGGGGTTCAAGAATCATCTGCATCAAGTGTAAGTCACGGTGGGAT
GGCAGCTGGCACCAGCTGGGCACATATGTACACCTACGACATCCTGGCTGCCTCTCCATGTTGTCAGGTAG
GTACTGAACACACTGAGGGAGCAGTGGGTGATATTAGGCTTCTGTCCCCAAGTg
```

Grafik 21: Dargestellt ist die Nukleotidsequenz der Spleißvariante II. Das Primerpaar HECA Ex3a1 ist unterstrichen.

```
MHLQCFYEWESSILVQFNCIGRARSWNEKQCRQNMWTKKGYDLAFRFCSCRCGQGHLLKKDWDWYQVKRMQ
DEKKKKSGSEKNTGRPPGEAAEEAKKCRPPNKPQKGPSHDLPRRHSMRQNSQEKAVGAAAYGARSPGGS
PGQSPPTGYSILSPAHFSGPRSSRYLGEFLKNAIHLEPHKKAMAGGHVFRNAHFDYSPAGLAVHRGGHFD
TPVQFLRRLDLSELLTHIPRHLNTHFVRMEDDAQVGQGEDLRKFILAALSASHRNVVNCALCHRALPVF
EQFPLVDGTLFLSPSRHDEIEYDVPCHLQGRLMHLYAVCVDCLEGVHKIICIKCKSRWDGSWHQLGTMYT
YDILAASPCQVGTETEGAVGDIRLLSP
```

Grafik 22: Dargestellt ist die Aminosäuresequenz des Produkts von Spleißvariante I

7 Literaturverzeichnis

- (1) AceView: Gene:HECA, a comprehensive annotation of human, mouse and worm genes with mRNAs or ESTs AceView. Online verfügbar unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Acembly/av.cgi?exdb=AceView&db=36a&term=HECA&submit=Go>, zuletzt geprüft am 04.06.2010.
- (2) Agarwal, Jai Prakash; Nemade, Bhushan; Murthy, Vedang; Ghosh-Laskar, Sarbani; Budrukkar, Ashwini; Gupta, Tejpal et al. (2008): Hypofractionated, palliative radiotherapy for advanced head and neck cancer. In: Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology, Jg. 89, H. 1, S. 51–56. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.radonc.2008.06.007.
- (3) Al-mamgani, Abraham; Tans, Lisa; van rooij, Peter H. E.; Noever, Inge; Baatenburg jong, Robert J. de; Levendag, Peter C. (2009): Hypofractionated radiotherapy denoted as the "Christie scheme": an effective means of palliating patients with head and neck cancers not suitable for curative treatment. In: Acta oncologica (Stockholm, Sweden), Jg. 48, H. 4, S. 562–570. Online verfügbar unter doi:10.1080/02841860902740899.
- (4) Andrews, Elizabeth; Seaman, William T.; Webster-Cyriaque, Jennifer (2009): Oropharyngeal carcinoma in non-smokers and non-drinkers: a role for HPV. In: Oral oncology, Jg. 45, H. 6, S. 486–491. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.oraloncology.2008.07.008.
- (5) Argiris, Athanassios; Karamouzis, Michalis V.; Raben, David; Ferris, Robert L. (2008): Head and neck cancer. In: Lancet, Jg. 371, H. 9625, S. 1695–1709. Online verfügbar unter doi:10.1016/S0140-6736(08)60728-X.
- (6) Avissar, Michele; Christensen, Brock C.; Kelsey, Karl T.; Marsit, Carmen J. (2009): MicroRNA expression ratio is predictive of head and neck squamous cell carcinoma. In: Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, Jg. 15, H. 8, S. 2850–2855. Online verfügbar unter doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-3131.
- (7) Avissar, Michele; McClean, Michael D.; Kelsey, Karl T.; Marsit, Carmen J. (2009): MicroRNA expression in head and neck cancer associates with alcohol consumption and survival. In: Carcinogenesis, Jg. 30, H. 12, S. 2059–2063. Online verfügbar unter doi:10.1093/carcin/bgp277.
- (8) Baatenburg Jong, R. J. de; Hermans, J.; Molenaar, J.; Briaire, J. J.; Le Cessie, S. (2001): Prediction of survival in patients with head and neck cancer. In: Head & neck, Jg. 23, H. 9, S. 718–724.
- (9) Bach, Erika A.; Vincent, Stephane; Zeidler, Martin P.; Perrimon, Norbert (2003): A sensitized genetic screen to identify novel regulators and components of the Drosophila janus kinase/signal transducer and activator of transcription pathway. In: Genetics, Jg. 165, H. 3, S. 1149–1166.

- (10) Bär, Michael; Bär, Dorit; Lehmann, Bodo (2009): Selection and validation of candidate housekeeping genes for studies of human keratinocytes--review and recommendations. In: *The Journal of investigative dermatology*, Jg. 129, H. 3, S. 535–537. Online verfügbar unter doi:10.1038/jid.2008.428.
- (11) Barghorn, A.; Speel, E. J.; Farspour, B.; Saremaslani, P.; Schmid, S.; Perren, A. et al. (2001): Putative tumor suppressor loci at 6q22 and 6q23-q24 are involved in the malignant progression of sporadic endocrine pancreatic tumors. In: *The American journal of pathology*, Jg. 158, H. 6, S. 1903–1911.
- (12) Bauer, Richard; Dowejko, Albert; Driemel, Oliver; Bosserhoff, A-K; Reichert, T. E. (2008): Truncated P-cadherin is produced in oral squamous cell carcinoma. In: *The FEBS journal*, Jg. 275, H. 16, S. 4198–4210. Online verfügbar unter doi:10.1111/j.1742-4658.2008.06567.x.
- (13) Beck-Mannagetta, J.; Hutarew, G. (2009): [Squamous cell carcinoma and potentially malignant disorders of the oral mucosa.]. In: *Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete*. Online verfügbar unter doi:10.1007/s00105-009-1801-6.
- (14) Bernier, J.; Schneider, D. (2007): Cetuximab combined with radiotherapy: an alternative to chemoradiotherapy for patients with locally advanced squamous cell carcinomas of the head and neck? In: *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, Jg. 43, H. 1, S. 35–45. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.ejca.2006.08.035.
- (15) Bernier, Jacques; Domenge, Christian; Ozsahin, Mahmut; Matuszewska, Katarzyna; Lefèbvre, Jean-Louis; Greiner, Richard H. et al. (2004): Postoperative irradiation with or without concomitant chemotherapy for locally advanced head and neck cancer. In: *The New England journal of medicine*, Jg. 350, H. 19, S. 1945–1952. Online verfügbar unter doi:10.1056/NEJMoa032641.
- (16) Bilde, Anders; Buchwald, Christian von; Dabelsteen, Erik; Therkildsen, Marianne Hamilton; Dabelsteen, Sally (2009): Molecular markers in the surgical margin of oral carcinomas. In: *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*, Jg. 38, H. 1, S. 72–78. Online verfügbar unter doi:10.1111/j.1600-0714.2008.00715.x.
- (17) bio2j_large.gif (GIF-Grafik, 1121x521 Pixel) (2007). Online verfügbar unter http://genome.gov/Images/EdKit/bio2j_large.gif, zuletzt aktualisiert am 29.03.2007, zuletzt geprüft am 22.06.2010.
- (18) Biolchini, F.; Pollastri, G.; Figurelli, S.; Chiarini, L.: Carcinogen metabolism, DNA damage repair and oral head and neck squamocellular carcinoma (HNSCC). A review. In: *Minerva stomatologica*, Jg. 54, H. 7-8, S. 405–414.
- (19) Böcker, Werner; Denk, Helmut; Heitz, Philipp U., et al. (Hg.) (2008): *Lehrbuch Pathologie*: Urban & Fischer in Elsevier.

- (20) Boldrup, L.; Coates, P. J.; Gu, X.; Nylander, K. (2007): DeltaNp63 isoforms regulate CD44 and keratins 4, 6, 14 and 19 in squamous cell carcinoma of head and neck. In: *The Journal of pathology*, Jg. 213, H. 4, S. 384–391. Online verfügbar unter doi:10.1002/path.2237.
- (21) Bond, Michelle R.; Kohler, Jennifer J. (2007): Chemical methods for glycoprotein discovery. In: *Current opinion in chemical biology*, Jg. 11, H. 1, S. 52–58. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.cbpa.2006.11.032.
- (22) Brellier, F.; Tucker, R. P.; Chiquet-Ehrismann, R. (2009): Tenascins and their implications in diseases and tissue mechanics. In: *Scandinavian journal of medicine & science in sports*, Jg. 19, H. 4, S. 511–519. Online verfügbar unter doi:10.1111/j.1600-0838.2009.00916.x.
- (23) Brinkman, Brigitta M. N. (2004): Splice variants as cancer biomarkers. In: *Clinical biochemistry*, Jg. 37, H. 7, S. 584–594. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.clinbiochem.2004.05.015.
- (24) Brooks, Susan A. (2006): Protein glycosylation in diverse cell systems: implications for modification and analysis of recombinant proteins. In: *Expert review of proteomics*, Jg. 3, H. 3, S. 345–359. Online verfügbar unter doi:10.1586/14789450.3.3.345.
- (25) Brooks, Susan A. (2009): Strategies for analysis of the glycosylation of proteins: current status and future perspectives. In: *Molecular biotechnology*, Jg. 43, H. 1, S. 76–88. Online verfügbar unter doi:10.1007/s12033-009-9184-6.
- (26) Bustin, S. A. (2000): Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. In: *Journal of molecular endocrinology*, Jg. 25, H. 2, S. 169–193.
- (27) Bustin, S. A. (2002): Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. In: *Journal of molecular endocrinology*, Jg. 29, H. 1, S. 23–39.
- (28) Cabanillas, Rubén; Rodrigo, Juan Pablo; Astudillo, Aurora; Domínguez, Francisco; Suárez, Carlos; Chiara, Maria Dolores (2007): P53 expression in squamous cell carcinomas of the supraglottic larynx and its lymph node metastases: new results for an old question. In: *Cancer*, Jg. 109, H. 9, S. 1791–1798. Online verfügbar unter doi:10.1002/cncr.22646.
- (29) Capaccio, P.; Prunerì, G.; Carboni, N.; Pagliari, A. V.; Quatela, M.; Cesana, B. M.; Pignataro, L. (2000): Cyclin D1 expression is predictive of occult metastases in head and neck cancer patients with clinically negative cervical lymph nodes. In: *Head & neck*, Jg. 22, H. 3, S. 234–240.
- (30) CCDS: CCDS Report for Consensus CDS. Online verfügbar unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/CCDS/CcdsBrowse.cgi?REQUEST=GV&DATA=5591>, zuletzt geprüft am 04.06.2010.

- (31) Charette, Steve J.; Lambert, Herman; Nadeau, Philippe J.; Landry, Jacques (2010): Protein quantification by chemiluminescent Western blotting: elimination of the antibody factor by dilution series and calibration curve. In: *Journal of immunological methods*, Jg. 353, H. 1-2, S. 148–150. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.jim.2009.12.007.
- (32) Chaudhary, Ajay Kumar; Singh, Mamta; Bharti, Alok C.; Asotra, Kamlesh; Sundaram, Shanthi; Mehrotra, Ravi (2010): Genetic polymorphisms of matrix metalloproteinases and their inhibitors in potentially malignant and malignant lesions of the head and neck. In: *Journal of biomedical science*, Jg. 17, S. 10. Online verfügbar unter doi:10.1186/1423-0127-17-10.
- (33) Chien, Chih-Cheng; Chang, Chun-Chao; Yang, Shung-Haur; Chen, Shu-Hung; Huang, Chi-Jung (2006): A homologue of the *Drosophila* headcase protein is a novel tumor marker for early-stage colorectal cancer. In: *Oncology reports*, Jg. 15, H. 4, S. 919–926.
- (34) Childs, Geoffrey; Fazzari, Melissa; Kung, Gloria; Kawachi, Nicole; Brandwein-Gensler, Margaret; McLemore, Michael et al. (2009): Low-level expression of microRNAs let-7d and miR-205 are prognostic markers of head and neck squamous cell carcinoma. In: *The American journal of pathology*, Jg. 174, H. 3, S. 736–745. Online verfügbar unter doi:10.2353/ajpath.2009.080731.
- (35) Choi, S.; Myers, J. N. (2008): Molecular pathogenesis of oral squamous cell carcinoma: implications for therapy. In: *Journal of dental research*, Jg. 87, H. 1, S. 14–32.
- (36) Chung, Christine H.; Gillison, Maura L. (2009): Human papillomavirus in head and neck cancer: its role in pathogenesis and clinical implications. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, Jg. 15, H. 22, S. 6758–6762. Online verfügbar unter doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-0784.
- (37) Cojocariu, O. M.; Huguet, F.; Lefevre, M.; Périé, S. (2009): [Prognosis and predictive factors in head-and-neck cancers]. In: *Bulletin du cancer*, Jg. 96, H. 4, S. 369–378. Online verfügbar unter doi:10.1684/bdc.2009.0777.
- (38) Cooper, Jay S.; Pajak, Thomas F.; Forastiere, Arlene A.; Jacobs, John; Campbell, Bruce H.; Saxman, Scott B. et al. (2004): Postoperative concurrent radiotherapy and chemotherapy for high-risk squamous-cell carcinoma of the head and neck. In: *The New England journal of medicine*, Jg. 350, H. 19, S. 1937–1944. Online verfügbar unter doi:10.1056/NEJMoa032646.
- (39) Corvò, Renzo (2007): Evidence-based radiation oncology in head and neck squamous cell carcinoma. In: *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*, Jg. 85, H. 1, S. 156–170. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.radonc.2007.04.002.
- (40) Cowell, John K.; Hawthorn, Lesleyann (2007): The application of microarray technology to the analysis of the cancer genome. In: *Current molecular medicine*, Jg. 7, H. 1, S. 103–120.
- (41) Cox, Brian; Emili, Andrew (2006): Tissue subcellular fractionation and protein extraction for use in mass-spectrometry-based proteomics. In: *Nature protocols*, Jg. 1, H. 4, S. 1872–1878. Online verfügbar unter doi:10.1038/nprot.2006.273.

- (42) Cree, Ian A.; Glaysher, Sharon; Harvey, Alan L. (2010): Efficacy of anti-cancer agents in cell lines versus human primary tumour tissue. In: *Current opinion in pharmacology*, Jg. 10, H. 4, S. 375–379. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.coph.2010.05.001.
- (43) Cruz, Mariana; Enes, Margarida; Pereira, Marta; Dourado, Marília; Sarmento Ribeiro, Ana Bela: [Experimental models in oncology: contribution of cell culture on understanding the biology of cancer]. In: *Revista portuguesa de pneumologia*, Jg. 15, H. 4, S. 669–682.
- (44) Deng, Wu-Guo; Nishizaki, Masahiko; Fang, Bingliang; Roth, Jack A.; Ji, Lin (2007): Induction of apoptosis by tumor suppressor FHIT via death receptor signaling pathway in human lung cancer cells. In: *Biochemical and biophysical research communications*, Jg. 355, H. 4, S. 993–999. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.bbrc.2007.02.067.
- (45) Dephoure, Noah; Zhou, Chunshui; Villén, Judit; Beausoleil, Sean A.; Bakalarski, Corey E.; Elledge, Stephen J.; Gygi, Steven P. (2008): A quantitative atlas of mitotic phosphorylation. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jg. 105, H. 31, S. 10762–10767. Online verfügbar unter doi:10.1073/pnas.0805139105.
- (46) Dickson, Clive (2008): Protein techniques: immunoprecipitation, in vitro kinase assays, and Western blotting. In: *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), Jg. 461, S. 735–744. Online verfügbar unter doi:10.1007/978-1-60327-483-8_53.
- (47) Dowejko, Albert; Bauer, Richard J.; Müller-Richter, Urs D. A.; Reichert, Torsten E. (2009): The human homolog of the *Drosophila* headcase protein slows down cell division of head and neck cancer cells. In: *Carcinogenesis*, Jg. 30, H. 10, S. 1678–1685. Online verfügbar unter doi:10.1093/carcin/bgp189.
- (48) Driemel, O.; Dahse, R.; Berndt, A.; Pistner, H.; Hakim, S. G.; Zardi, L. et al. (2007): High-molecular tenascin-C as an indicator of atypical cells in oral brush biopsies. In: *Clinical oral investigations*, Jg. 11, H. 1, S. 93–99. Online verfügbar unter doi:10.1007/s00784-006-0086-8.
- (49) Driemel, O.; Dahse, R.; Hakim, S. G.; Tsioutsias, T.; Pistner, H.; Reichert, T. E.; Kosmehl, H. (2007): Laminin-5 immunocytochemistry: a new tool for identifying dysplastic cells in oral brush biopsies. In: *Cytopathology : official journal of the British Society for Clinical Cytology*, Jg. 18, H. 6, S. 348–355. Online verfügbar unter doi:10.1111/j.1365-2303.2006.00401.x.
- (50) Driemel, Oliver; Kosmehl, Hartwig; Rosenhahn, Julia; Berndt, Alexander; Reichert, Torsten E.; Zardi, Luciano; Dahse, Regine: Expression analysis of extracellular matrix components in brush biopsies of oral lesions. In: *Anticancer research*, Jg. 27, H. 3B, S. 1565–1570.
- (51) Driemel, Oliver; Kunkel, Martin; Hullmann, Markus; Eggeling, Ferdinand von; Müller-Richter, Urs; Kosmehl, Hartwig; Reichert, Torsten E. (2007): Diagnosis of oral squamous cell carcinoma and its precursor lesions. In: *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology : JDDG*, Jg. 5, H. 12, S. 1095–1100. Online verfügbar unter doi:10.1111/j.1610-0387.2007.06397.x.

- (52) Dube, Danielle H.; Bertozzi, Carolyn R. (2005): Glycans in cancer and inflammation--potential for therapeutics and diagnostics. In: *Nature reviews. Drug discovery*, Jg. 4, H. 6, S. 477–488. Online verfügbar unter doi:10.1038/nrd1751.
- (53) ECgene : Gene Modeling with Alternative Splicing (2007). Online verfügbar unter <http://genome.ewha.ac.kr/ECgene/>, zuletzt aktualisiert am 04.02.2007, zuletzt geprüft am 04.06.2010.
- (54) Egloff, Ann Marie; Grandis, Jennifer R. (2008): Targeting epidermal growth factor receptor and SRC pathways in head and neck cancer. In: *Seminars in oncology*, Jg. 35, H. 3, S. 286–297. Online verfügbar unter doi:10.1053/j.seminoncol.2008.03.008.
- (55) Ehrlich, M. (2006): Cancer-linked DNA hypomethylation and its relationship to hypermethylation. In: *Current topics in microbiology and immunology*, Jg. 310, S. 251–274.
- (56) Estella, Carlos; Rieckhof, Gabrielle; Calleja, Manuel; Morata, Ginés (2003): The role of buttonhead and Sp1 in the development of the ventral imaginal discs of *Drosophila*. In: *Development (Cambridge, England)*, Jg. 130, H. 24, S. 5929–5941. Online verfügbar unter doi:10.1242/dev.00832.
- (57) Fakhry, Carole; Gillison, Maura L. (2006): Clinical implications of human papillomavirus in head and neck cancers. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, Jg. 24, H. 17, S. 2606–2611. Online verfügbar unter doi:10.1200/JCO.2006.06.1291.
- (58) Fakhry, Carole; Westra, William H.; Li, Sigui; Cmelak, Anthony; Ridge, John A.; Pinto, Harlan et al. (2008): Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. In: *Journal of the National Cancer Institute*, Jg. 100, H. 4, S. 261–269. Online verfügbar unter doi:10.1093/jnci/djn011.
- (59) Farley, Adam R.; Link, Andrew J. (2009): Identification and quantification of protein posttranslational modifications. In: *Methods in enzymology*, Jg. 463, S. 725–763. Online verfügbar unter doi:10.1016/S0076-6879(09)63040-8.
- (60) Fedele, Stefano (2009): Diagnostic aids in the screening of oral cancer. In: *Head & neck oncology*, Jg. 1, H. 1, S. 5. Online verfügbar unter doi:10.1186/1758-3284-1-5.
- (61) Franz, Marcus; Hansen, Torsten; Borsi, Laura; Geier, Christiane; Hyckel, Peter; Schleier, Peter et al. (2007): A quantitative co-localization analysis of large unspliced tenascin-C(L) and laminin-5/gamma2-chain in basement membranes of oral squamous cell carcinoma by confocal laser scanning microscopy. In: *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*, Jg. 36, H. 1, S. 6–11. Online verfügbar unter doi:10.1111/j.1600-0714.2006.00492.x.

- (62) Franz, Marcus; Hansen, Torsten; Richter, Petra; Borsi, Laura; Böhmer, Frank-D; Hyckel, Peter et al. (2006): Complex formation of the laminin-5 gamma2 chain and large unspliced tenascin-C in oral squamous cell carcinoma in vitro and in situ: implications for sequential modulation of extracellular matrix in the invasive tumor front. In: *Histochemistry and cell biology*, Jg. 126, H. 1, S. 125–131. Online verfügbar unter doi:10.1007/s00418-005-0126-5.
- (63) Franzmann, Elizabeth J.; Reategui, Erika P.; Carraway, Kermit L.; Hamilton, Kara L.; Weed, Donald T.; Goodwin, W. Jarrard (2005): Salivary soluble CD44: a potential molecular marker for head and neck cancer. In: *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, Jg. 14, H. 3, S. 735–739. Online verfügbar unter doi:10.1158/1055-9965.EPI-04-0546.
- (64) Franzmann, Elizabeth J.; Reategui, Erika P.; Pedroso, Felipe; Pernas, Francisco G.; Karakullukcu, Baris M.; Carraway, Kermit L. et al. (2007): Soluble CD44 is a potential marker for the early detection of head and neck cancer. In: *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, Jg. 16, H. 7, S. 1348–1355. Online verfügbar unter doi:10.1158/1055-9965.EPI-06-0011.
- (65) Gallagher, Sean; Chakavarti, Deb (2008): Immunoblot analysis. In: *Journal of visualized experiments : JoVE*, H. 16. Online verfügbar unter doi:10.3791/759.
- (66) Garnis, Cathie; Baldwin, Corisande; Zhang, Lewei; Rosin, Miriam P.; Lam, Wan L. (2003): Use of complete coverage array comparative genomic hybridization to define copy number alterations on chromosome 3p in oral squamous cell carcinomas. In: *Cancer research*, Jg. 63, H. 24, S. 8582–8585.
- (67) Gauthier, Daniel J.; Lazure, Claude (2008): Complementary methods to assist subcellular fractionation in organellar proteomics. In: *Expert review of proteomics*, Jg. 5, H. 4, S. 603–617. Online verfügbar unter doi:10.1586/14789450.5.4.603.
- (68) Gillison, Maura L.; D'Souza, Gypsyamber; Westra, William; Sugar, Elizabeth; Xiao, Weihong; Begum, Shahnaz; Viscidi, Raphael (2008): Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papillomavirus type 16-negative head and neck cancers. In: *Journal of the National Cancer Institute*, Jg. 100, H. 6, S. 407–420. Online verfügbar unter doi:10.1093/jnci/djn025.
- (69) Giot, L.; Bader, J. S.; Brouwer, C.; Chaudhuri, A.; Kuang, B.; Li, Y. et al. (2003): A protein interaction map of *Drosophila melanogaster*. In: *Science (New York, N.Y.)*, Jg. 302, H. 5651, S. 1727–1736. Online verfügbar unter doi:10.1126/science.1090289.
- (70) Görögh, Tibor; Beier, Ulf H.; Bäumken, Jens; Meyer, Jens E.; Hoffmann, Markus; Gottschlich, Stefan; Maune, Steffen (2006): Metalloproteinases and their inhibitors: influence on tumor invasiveness and metastasis formation in head and neck squamous cell carcinomas. In: *Head & neck*, Jg. 28, H. 1, S. 31–39. Online verfügbar unter doi:10.1002/hed.20298.
- (71) Green, Douglas R.; Kroemer, Guido (2009): Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. In: *Nature*, Jg. 458, H. 7242, S. 1127–1130. Online verfügbar unter doi:10.1038/nature07986.

- (72) Haddad, Robert I.; Shin, Dong M. (2008): Recent advances in head and neck cancer. In: The New England journal of medicine, Jg. 359, H. 11, S. 1143–1154. Online verfügbar unter doi:10.1056/NEJMra0707975.
- (73) Hama, Takanori; Yuza, Yuki; Saito, Yoshimichi; O-uchi, Jin; Kondo, Shu; Okabe, Masataka et al. (2009): Prognostic significance of epidermal growth factor receptor phosphorylation and mutation in head and neck squamous cell carcinoma. In: The oncologist, Jg. 14, H. 9, S. 900–908. Online verfügbar unter doi:10.1634/theoncologist.2009-0058.
- (74) Harari, P. M. (2004): Epidermal growth factor receptor inhibition strategies in oncology. In: Endocrine-related cancer, Jg. 11, H. 4, S. 689–708. Online verfügbar unter doi:10.1677/erc.1.00600.
- (75) Hashimoto, Y.; Oga, A.; Okami, K.; Imae, Y.; Yamashita, Y.; Sasaki, K. (2000): Relationship between cytogenetic aberrations by CGH coupled with tissue microdissection and DNA ploidy by laser scanning cytometry in head and neck squamous cell carcinoma. In: Cytometry, Jg. 40, H. 2, S. 161–166.
- (76) He, Chunjiang; Zhou, Fang; Zuo, Zhixiang; Cheng, Hanhua; Zhou, Rongjia (2009): A global view of cancer-specific transcript variants by subtractive transcriptome-wide analysis. In: PloS one, Jg. 4, H. 3, S. e4732. Online verfügbar unter doi:10.1371/journal.pone.0004732.
- (77) Heo, D. S.; Snyderman, C.; Gollin, S. M.; Pan, S.; Walker, E.; Deka, R. et al. (1989): Biology, cytogenetics, and sensitivity to immunological effector cells of new head and neck squamous cell carcinoma lines. In: Cancer research, Jg. 49, H. 18, S. 5167–5175.
- (78) Hindermann, W.; Berndt, A.; Borsi, L.; Luo, X.; Hyckel, P.; Katenkamp, D.; Kosmehl, H. (1999): Synthesis and protein distribution of the unspliced large tenascin-C isoform in oral squamous cell carcinoma. In: The Journal of pathology, Jg. 189, H. 4, S. 475–480. Online verfügbar unter doi:10.1002/(SICI)1096-9896(199912)189:4<475::AID-PATH462>3.0.CO;2-V.
- (79) Hiss, Jan A.; Schneider, Gisbert (2009): Architecture, function and prediction of long signal peptides. In: Briefings in bioinformatics, Jg. 10, H. 5, S. 569–578. Online verfügbar unter doi:10.1093/bib/bbp030.
- (80) House, Amy E.; Lynch, Kristen W. (2008): Regulation of alternative splicing: more than just the ABCs. In: The Journal of biological chemistry, Jg. 283, H. 3, S. 1217–1221. Online verfügbar unter doi:10.1074/jbc.R700031200.
- (81) Hu, Shen; Wong, David T. (2007): Oral cancer proteomics. In: Current opinion in molecular therapeutics, Jg. 9, H. 5, S. 467–476.
- (82) Huber, Lukas A.; Pfaller, Kristian; Vietor, Ilja (2003): Organelle proteomics: implications for subcellular fractionation in proteomics. In: Circulation research, Jg. 92, H. 9, S. 962–968. Online verfügbar unter doi:10.1161/01.RES.0000071748.48338.25.

- (83) Hughes, Timothy R.; Hiley, Shawna L.; Saltzman, Arneet L.; Babak, Tomas; Blencowe, Benjamin J. (2006): Microarray analysis of RNA processing and modification. In: *Methods in enzymology*, Jg. 410, S. 300–316. Online verfügbar unter doi:10.1016/S0076-6879(06)10014-2.
- (84) Hui, Angela B. Y.; Takano, Hirokuni; Lo, Kwok-Wai; Kuo, Wen-Lin; Lam, Cleo N. Y.; Tong, Carol Y. K. et al. (2005): Identification of a novel homozygous deletion region at 6q23.1 in medulloblastomas using high-resolution array comparative genomic hybridization analysis. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, Jg. 11, H. 13, S. 4707–4716. Online verfügbar unter doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-0128.
- (85) Hui, Lijian; Zhang, Xin; Wu, Xin; Lin, Zhixin; Wang, Qingkang; Li, Yixue; Hu, Gengxi (2004): Identification of alternatively spliced mRNA variants related to cancers by genome-wide ESTs alignment. In: *Oncogene*, Jg. 23, H. 17, S. 3013–3023. Online verfügbar unter doi:10.1038/sj.onc.1207362.
- (86) Human Protein Atlas. Online verfügbar unter http://www.proteinatlas.org/gene_info.php?ensembl_gene_id=ENSG00000112406, zuletzt geprüft am 19.09.2010.
- (87) Hunter, Keith D.; Parkinson, E. Ken; Harrison, Paul R. (2005): Profiling early head and neck cancer. In: *Nature reviews. Cancer*, Jg. 5, H. 2, S. 127–135. Online verfügbar unter doi:10.1038/nrc1549.
- (88) Jensen, Ole N. (2006): Interpreting the protein language using proteomics. In: *Nature reviews. Molecular cell biology*, Jg. 7, H. 6, S. 391–403. Online verfügbar unter doi:10.1038/nrm1939.
- (89) Jeyaraj, Selvi; O'Brien, Dennis M.; Chandler, Dawn S. (2009): MDM2 and MDM4 splicing: an integral part of the cancer spliceome. In: *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, Jg. 14, S. 2647–2656.
- (90) Kane, S. V.; Gupta, M.; Kakade, A. C.; Cruz, A. d' (2006): Depth of invasion is the most significant histological predictor of subclinical cervical lymph node metastasis in early squamous carcinomas of the oral cavity. In: *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology*, Jg. 32, H. 7, S. 795–803. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.ejso.2006.05.004.
- (91) Kim, Mee Young; Hur, Jung; Jeong, Sunjoo (2009): Emerging roles of RNA and RNA-binding protein network in cancer cells. In: *BMB reports*, Jg. 42, H. 3, S. 125–130.
- (92) Kim, Namshin; Lee, Christopher (2008): Bioinformatics detection of alternative splicing. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, Jg. 452, S. 179–197. Online verfügbar unter doi:10.1007/978-1-60327-159-2_9.
- (93) Koike, Hirofumi; Uzawa, Katsuhiro; Nakashima, Dai; Shimada, Ken; Kato, Yoshikuni; Higo, Morihiro et al. (2005): Identification of differentially expressed proteins in oral squamous cell carcinoma using a global proteomic approach. In: *International journal of oncology*, Jg. 27, H. 1, S. 59–67.

- (94) Körner, Meike; Miller, Laurence J. (2009): Alternative splicing of pre-mRNA in cancer: focus on G protein-coupled peptide hormone receptors. In: *The American journal of pathology*, Jg. 175, H. 2, S. 461–472. Online verfügbar unter doi:10.2353/ajpath.2009.081135.
- (95) Kosmehl, H.; Berndt, A.; Strassburger, S.; Borsi, L.; Rousselle, P.; Mandel, U. et al. (1999): Distribution of laminin and fibronectin isoforms in oral mucosa and oral squamous cell carcinoma. In: *British journal of cancer*, Jg. 81, H. 6, S. 1071–1079. Online verfügbar unter doi:10.1038/sj.bjc.6690809.
- (96) Ku, Tony K. S.; Nguyen, Dan C.; Karaman, Mazen; Gill, Parkash; Hacia, Joseph G.; Crowe, David L. (2007): Loss of p53 expression correlates with metastatic phenotype and transcriptional profile in a new mouse model of head and neck cancer. In: *Molecular cancer research : MCR*, Jg. 5, H. 4, S. 351–362. Online verfügbar unter doi:10.1158/1541-7786.MCR-06-0238.
- (97) Kurien, Biji T.; Scofield, R. Hal (2003): Protein blotting: a review. In: *Journal of immunological methods*, Jg. 274, H. 1-2, S. 1–15.
- (98) Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: *Nature*, Jg. 227, H. 5259, S. 680–685.
- (99) Lallemand, Benjamin; Evrard, Alexandre; Combescure, Christophe; Chapuis, Heliette; Chambon, Guillaume; Raynal, Caroline et al. (2009): Clinical relevance of nine transcriptional molecular markers for the diagnosis of head and neck squamous cell carcinoma in tissue and saliva rinse. In: *BMC cancer*, Jg. 9, S. 370. Online verfügbar unter doi:10.1186/1471-2407-9-370.
- (100) Lareau, Liana F.; Brooks, Angela N.; Soergel, David A. W.; Meng, Qi; Brenner, Steven E. (2007): The coupling of alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay. In: *Advances in experimental medicine and biology*, Jg. 623, S. 190–211.
- (101) Larsen, Martin R.; Højrup, Peter; Roepstorff, Peter (2005): Characterization of gel-separated glycoproteins using two-step proteolytic digestion combined with sequential microcolumns and mass spectrometry. In: *Molecular & cellular proteomics : MCP*, Jg. 4, H. 2, S. 107–119. Online verfügbar unter doi:10.1074/mcp.M400068-MCP200.
- (102) Le Tourneau, Christophe; Siu, Lillian L. (2008): Molecular-targeted therapies in the treatment of squamous cell carcinomas of the head and neck. In: *Current opinion in oncology*, Jg. 20, H. 3, S. 256–263. Online verfügbar unter doi:10.1097/CCO.0b013e3282f9b575.
- (103) Lee, Christopher; Wang, Qi (2005): Bioinformatics analysis of alternative splicing. In: *Briefings in bioinformatics*, Jg. 6, H. 1, S. 23–33.
- (104) Lee, Yie Hou; Tan, Hwee Tong; Chung, Maxey C. M. (2010): Subcellular fractionation methods and strategies for proteomics. In: *Proteomics*, Jg. 10, H. 22, S. 3935–3956. Online verfügbar unter doi:10.1002/pmic.201000289.

- (105) Lemeta, Sebsebe; Salmenkivi, Kaisa; Pylkkänen, Lea; Sainio, Markku; Saarikoski, Sirkku T.; Arola, Johanna et al. (2006): Frequent loss of heterozygosity at 6q in pheochromocytoma. In: *Human pathology*, Jg. 37, H. 6, S. 749–754. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.humpath.2006.02.002.
- (106) León, Xavier; del Prado Venegas, María; Orús, César; López, Montserrat; García, Jacinto; Quer, Miquel (2009): Influence of the persistence of tobacco and alcohol use in the appearance of second neoplasm in patients with a head and neck cancer. A case-control study. In: *Cancer causes & control : CCC*, Jg. 20, H. 5, S. 645–652. Online verfügbar unter doi:10.1007/s10552-008-9277-8.
- (107) Lin, Jonathan H.; Walter, Peter; Yen, T. S. Benedict (2008): Endoplasmic reticulum stress in disease pathogenesis. In: *Annual review of pathology*, Jg. 3, S. 399–425. Online verfügbar unter doi:10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.151434.
- (108) Lo, Wan-Yu; Tsai, Ming-Hsui; Tsai, Yuhshin; Hua, Chun-Hung; Tsai, Fuu-Jen; Huang, Shiuan-Yi et al. (2007): Identification of over-expressed proteins in oral squamous cell carcinoma (OSCC) patients by clinical proteomic analysis. In: *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, Jg. 376, H. 1-2, S. 101–107. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.cca.2006.06.030.
- (109) Lukong, Kiven E.; Chang, Kai-wei; Khandjian, Edouard W.; Richard, Stéphane (2008): RNA-binding proteins in human genetic disease. In: *Trends in genetics : TIG*, Jg. 24, H. 8, S. 416–425. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.tig.2008.05.004.
- (110) Lydiatt, W. M.; Davidson, B. J.; Schantz, S. P.; Caruana, S.; Chaganti, R. S. (1998): 9p21 deletion correlates with recurrence in head and neck cancer. In: *Head & neck*, Jg. 20, H. 2, S. 113–118.
- (111) Lyons, A. J.; Jones, J. (2007): Cell adhesion molecules, the extracellular matrix and oral squamous carcinoma. In: *International journal of oral and maxillofacial surgery*, Jg. 36, H. 8, S. 671–679. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.ijom.2007.04.002.
- (112) MacDonald, Bryan T.; Tamai, Keiko; He, Xi (2009): Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. In: *Developmental cell*, Jg. 17, H. 1, S. 9–26. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.devcel.2009.06.016.
- (113) Makino, N.; Yamato, T.; Inoue, H.; Furukawa, T.; Abe, T.; Yokoyama, T. et al. (2001): Isolation and characterization of the human gene homologous to the *Drosophila* headcase (*hdc*) gene in chromosome bands 6q23-q24, a region of common deletion in human pancreatic cancer. In: *DNA sequence : the journal of DNA sequencing and mapping*, Jg. 11, H. 6, S. 547–553.
- (114) Mann, Matthias; Jensen, Ole N. (2003): Proteomic analysis of post-translational modifications. In: *Nature biotechnology*, Jg. 21, H. 3, S. 255–261. Online verfügbar unter doi:10.1038/nbt0303-255.
- (115) Maria, Salvatore de; Pannone, Giuseppe; Bufo, Pantaleo; Santoro, Angela; Serpico, Rosario; Metafora, Salvatore et al. (2009): Survivin gene-expression and splicing isoforms in oral squamous cell carcinoma. In: *Journal of cancer research and clinical oncology*, Jg. 135, H. 1, S. 107–116. Online verfügbar unter doi:10.1007/s00432-008-0433-z.

- (116) Martin, Christa Lese; Reshmi, Shalini C.; Ried, Thomas; Gottberg, William; Wilson, John W.; Reddy, Jaya K. et al. (2008): Chromosomal imbalances in oral squamous cell carcinoma: examination of 31 cell lines and review of the literature. In: *Oral oncology*, Jg. 44, H. 4, S. 369–382. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.oraloncology.2007.05.003.
- (117) Masuda, Muneyuki; Suzui, Masumi; Yasumatu, Ryuji; Nakashima, Torahiko; Kuratomi, Yuichiro; Azuma, Kaoru et al. (2002): Constitutive activation of signal transducers and activators of transcription 3 correlates with cyclin D1 overexpression and may provide a novel prognostic marker in head and neck squamous cell carcinoma. In: *Cancer research*, Jg. 62, H. 12, S. 3351–3355.
- (118) Mercer, Tim R.; Dinger, Marcel E.; Mattick, John S. (2009): Long non-coding RNAs: insights into functions. In: *Nature reviews. Genetics*, Jg. 10, H. 3, S. 155–159. Online verfügbar unter doi:10.1038/nrg2521.
- (119) Metzler, Philipp; Mollaoglu, Nur; Schwarz, Stephan; Neukam, Friedrich W.; Nkenke, Emeka; Ries, Jutta (2009): *MAGE-A as a novel approach in the diagnostic accuracy of oral squamous cell cancer: a case report*. In: *Head & neck oncology*, Jg. 1, S. 39. Online verfügbar unter doi:10.1186/1758-3284-1-39.
- (120) Mollaoglu, Nur; Vairaktaris, Eleftherios; Nkenke, Emeka; Neukam, Friedrich W.; Ries, Jutta (2008): Expression of *MAGE-A12* in oral squamous cell carcinoma. In: *Disease markers*, Jg. 24, H. 1, S. 27–32.
- (121) Moody, Cary A.; Laimins, Laimonis A. (2010): Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. In: *Nature reviews. Cancer*, Jg. 10, H. 8, S. 550–560. Online verfügbar unter doi:10.1038/nrc2886.
- (122) Moon, Chulso; Chae, Young Kwang; Lee, Juna (2010): Targeting epidermal growth factor receptor in head and neck cancer: lessons learned from cetuximab. In: *Experimental biology and medicine* (Maywood, N.J.), Jg. 235, H. 8, S. 907–920. Online verfügbar unter doi:10.1258/ebm.2009.009181.
- (123) Morton, Thomas H.; Cabay, Robert J.; Epstein, Joel B. (2007): Proliferative verrucous leukoplakia and its progression to oral carcinoma: report of three cases. In: *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*, Jg. 36, H. 5, S. 315–318. Online verfügbar unter doi:10.1111/j.1600-0714.2007.00499.x.
- (124) Mukherji, Mridul; Bell, Russell; Supekova, Lubica; Wang, Yan; Orth, Anthony P.; Batalov, Serge et al. (2006): Genome-wide functional analysis of human cell-cycle regulators. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jg. 103, H. 40, S. 14819–14824. Online verfügbar unter doi:10.1073/pnas.0604320103.
- (125) Musacchio, Andrea; Salmon, Edward D. (2007): The spindle-assembly checkpoint in space and time. In: *Nature reviews. Molecular cell biology*, Jg. 8, H. 5, S. 379–393. Online verfügbar unter doi:10.1038/nrm2163.

- (126) Neufcoeur, P. Ernoux; Arafa, M.; Delvenne, P.; Saussez, S. (2009): [Involvement of human papillomavirus in upper aero-digestive tracts cancers]. In: *Bulletin du cancer*, Jg. 96, H. 10, S. 941–950. Online verfügbar unter doi:10.1684/bdc.2009.0923.
- (127) Nguyen, N. P.; Chi, A.; Nguyen, L. M.; Ly, B. H.; Karlsson, U.; Vinh-Hung, V. (2009): Human papillomavirus-associated oropharyngeal cancer: a new clinical entity. In: *QJM : monthly journal of the Association of Physicians*. Online verfügbar unter doi:10.1093/qjmed/hcp176.
- (128) Noel, J-C; Fernandez-Aguilar, S.; Fayt, I.; Buxant, F.; Ansion, M-H; Simon, P.; Anaf, V. (2005): Laminin-5 gamma 2 chain expression in cervical intraepithelial neoplasia and invasive cervical carcinoma. In: *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica*, Jg. 84, H. 11, S. 1119–1123. Online verfügbar unter doi:10.1111/j.0001-6349.2005.00879.x.
- (129) Nouri-Aria, Kayhan T. (2008): In situ Hybridization. In: *Methods in molecular medicine*, Jg. 138, S. 331–347. Online verfügbar unter doi:10.1007/978-1-59745-366-0_27.
- (130) Ohta, M.; Inoue, H.; Cotticelli, M. G.; Kastury, K.; Baffa, R.; Palazzo, J. et al. (1996): The FHIT gene, spanning the chromosome 3p14.2 fragile site and renal carcinoma-associated t(3;8) breakpoint, is abnormal in digestive tract cancers. In: *Cell*, Jg. 84, H. 4, S. 587–597.
- (131) Okami, K.; Reed, A. L.; Cairns, P.; Koch, W. M.; Westra, W. H.; Wehage, S. et al. (1999): Cyclin D1 amplification is independent of p16 inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. In: *Oncogene*, Jg. 18, H. 23, S. 3541–3545. Online verfügbar unter doi:10.1038/sj.onc.1202837.
- (132) Pan, Quintin; Gorin, Michael A.; Teknos, Theodoros N. (2009): Pharmacotherapy of head and neck squamous cell carcinoma. In: *Expert opinion on pharmacotherapy*, Jg. 10, H. 14, S. 2291–2302. Online verfügbar unter doi:10.1517/14656560903136754.
- (133) Pentenero, Monica; Gandolfo, Sergio; Carrozzo, Marco (2005): Importance of tumor thickness and depth of invasion in nodal involvement and prognosis of oral squamous cell carcinoma: a review of the literature. In: *Head & neck*, Jg. 27, H. 12, S. 1080–1091. Online verfügbar unter doi:10.1002/hed.20275.
- (134) Peracaula, Rosa; Barrabés, Sílvia; Sarrats, Ariadna; Rudd, Pauline M.; Llorens, Rafael de (2008): Altered glycosylation in tumours focused to cancer diagnosis. In: *Disease markers*, Jg. 25, H. 4-5, S. 207–218.
- (135) Perez-Ordoñez, B.; Beauchemin, M.; Jordan, R. C. K. (2006): Molecular biology of squamous cell carcinoma of the head and neck. In: *Journal of clinical pathology*, Jg. 59, H. 5, S. 445–453. Online verfügbar unter doi:10.1136/jcp.2003.007641.
- (136) Pérez-Sayáns, Mario; Somoza-Martín, José M.; Barros-Angueira, Francisco; Reboiras-López, María D.; Gándara Rey, José M.; García-García, Abel (2009): Genetic and molecular alterations associated with oral squamous cell cancer (Review). In: *Oncology reports*, Jg. 22, H. 6, S. 1277–1282.

- (137) Pioch, Daniel; Schweder, Thomas; Jürgen, Britta (2008): Novel developments for improved detection of specific mRNAs by DNA chips. In: Applied microbiology and biotechnology, Jg. 80, H. 6, S. 953–963. Online verfügbar unter doi:10.1007/s00253-008-1680-2.
- (138) Rampias, Theodore; Sasaki, Clarence; Weinberger, Paul; Psyrris, Amanda (2009): E6 and e7 gene silencing and transformed phenotype of human papillomavirus 16-positive oropharyngeal cancer cells. In: Journal of the National Cancer Institute, Jg. 101, H. 6, S. 412–423. Online verfügbar unter doi:10.1093/jnci/djp017.
- (139) Reichart, P. A. (2003): [Oral precancerous conditions--an overview]. In: Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie : MKG, Jg. 7, H. 4, S. 201–207. Online verfügbar unter doi:10.1007/s10006-003-0483-y.
- (140) Reis, Celso A.; Osorio, Hugo; Silva, Luisa; Gomes, Catarina; David, Leonor (2010): Alterations in glycosylation as biomarkers for cancer detection. In: Journal of clinical pathology, Jg. 63, H. 4, S. 322–329. Online verfügbar unter doi:10.1136/jcp.2009.071035.
- (141) Rek, A.; Krenn, E.; Kungl, A. J. (2009): Therapeutically targeting protein-glycan interactions. In: British journal of pharmacology, Jg. 157, H. 5, S. 686–694. Online verfügbar unter doi:10.1111/j.1476-5381.2009.00226.x.
- (142) Ries, Jutta; Mollaoglu, Nur; Toyoshima, Takeshi; Vairaktaris, Eleftherios; Neukam, Friedrich W.; Ponader, Sabine; Nkenke, Emeka (2009): A novel multiple-marker method for the early diagnosis of oral squamous cell carcinoma. In: Disease markers, Jg. 27, H. 2, S. 75–84. Online verfügbar unter doi:10.3233/DMA-2009-0652.
- (143) Ries, Jutta; Vairaktaris, Eleftherios; Mollaoglu, Nur; Wiltfang, Joerg; Neukam, Friedrich W.; Nkenke, Emeka (2008): Expression of melanoma-associated antigens in oral squamous cell carcinoma. In: Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology, Jg. 37, H. 2, S. 88–93. Online verfügbar unter doi:10.1111/j.1600-0714.2007.00600.x.
- (144) Rino, José; Carmo-Fonseca, Maria (2009): The spliceosome: a self-organized macromolecular machine in the nucleus? In: Trends in cell biology, Jg. 19, H. 8, S. 375–384. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.tcb.2009.05.004.
- (145) RKI Krebs in Deutschland. Online verfügbar unter http://www.rki.de/cln_160/nn_204124/DE/Content/GBE/DachdokKrebs/KID/kid__no_de.html?__nnn=true, zuletzt geprüft am 24.10.2010.
- (146) Rodrigo, J. P.; García-Carracedo, D.; García, L. A.; Menéndez, St; Allonca, E.; González, M. V. et al. (2009): Distinctive clinicopathological associations of amplification of the cortactin gene at 11q13 in head and neck squamous cell carcinomas. In: The Journal of pathology, Jg. 217, H. 4, S. 516–523. Online verfügbar unter doi:10.1002/path.2462.
- (147) Rosenthal, Eben L.; Matrisian, Lynn M. (2006): Matrix metalloproteases in head and neck cancer. In: Head & neck, Jg. 28, H. 7, S. 639–648. Online verfügbar unter doi:10.1002/hed.20365.

- (148) Ross, Charles W.; Ouillet, Peter D.; Saddler, Chris M.; Shedden, Kerby A.; Malek, Sami N. (2007): Comprehensive analysis of copy number and allele status identifies multiple chromosome defects underlying follicular lymphoma pathogenesis. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, Jg. 13, H. 16, S. 4777–4785. Online verfügbar unter doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-0456.
- (149) Ruan, Wenjing; Lai, Maode (2007): Actin, a reliable marker of internal control? In: *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, Jg. 385, H. 1-2, S. 1–5. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.cca.2007.07.003.
- (150) Sambrook, Joseph; Russell, David W. (2001): *Molecular cloning. A laboratory manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- (151) Schmezer, P.; Plass, C. (2008): [Epigenetic aspects in carcinomas of the head and neck]. In: *HNO*, Jg. 56, H. 6, S. 594–602. Online verfügbar unter doi:10.1007/s00106-008-1720-3.
- (152) Schwarz, Stephan; Bier, Johannes; Driemel, Oliver; Reichert, Torsten E.; Hauke, Sven; Hartmann, Arndt; Brockhoff, Gero (2008): Losses of 3p14 and 9p21 as shown by fluorescence in situ hybridization are early events in tumorigenesis of oral squamous cell carcinoma and already occur in simple keratosis. In: *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*, Jg. 73, H. 4, S. 305–311. Online verfügbar unter doi:10.1002/cyto.a.20504.
- (153) Seo, Jawon; Lee, Kong-Joo (2004): Post-translational modifications and their biological functions: proteomic analysis and systematic approaches. In: *Journal of biochemistry and molecular biology*, Jg. 37, H. 1, S. 35–44.
- (154) Shah, Jatin P.; Gil, Ziv: Current concepts in management of oral cancer--surgery. In: *Oral oncology*, Jg. 45, H. 4-5, S. 394–401. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.oraloncology.2008.05.017.
- (155) Shahnava, S. A.; Regezi, J. A.; Bradley, G.; Dubé, I. D.; Jordan, R. C. (2000): p53 gene mutations in sequential oral epithelial dysplasias and squamous cell carcinomas. In: *The Journal of pathology*, Jg. 190, H. 4, S. 417–422. Online verfügbar unter doi:10.1002/(SICI)1096-9896(200003)190:4<417::AID-PATH544>3.0.CO;2-G.
- (156) Shi, Jia; Hu, Zhen; Pabon, Kirk; Scotto, Kathleen W. (2008): Caffeine regulates alternative splicing in a subset of cancer-associated genes: a role for SC35. In: *Molecular and cellular biology*, Jg. 28, H. 2, S. 883–895. Online verfügbar unter doi:10.1128/MCB.01345-07.
- (157) Smith, Cindy J.; Osborn, A. Mark (2009): Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. In: *FEMS microbiology ecology*, Jg. 67, H. 1, S. 6–20. Online verfügbar unter doi:10.1111/j.1574-6941.2008.00629.x.
- (158) Smith, Joel; Rattay, Tim; McConkey, Chris; Helliwell, Tim; Mehanna, Hisham (2009): Biomarkers in dysplasia of the oral cavity: a systematic review. In: *Oral oncology*, Jg. 45, H. 8, S. 647–653. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.oraloncology.2009.02.006.

- (159) Smith, Laura T.; Lin, Mauting; Brena, Romulo M.; Lang, James C.; Schuller, David E.; Otterson, Gregory A. et al. (2006): Epigenetic regulation of the tumor suppressor gene TCF21 on 6q23-q24 in lung and head and neck cancer. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jg. 103, H. 4, S. 982–987. Online verfügbar unter doi:10.1073/pnas.0510171102.
- (160) Sordat, I.; Rousselle, P.; Chaubert, P.; Petermann, O.; Aberdam, D.; Bosman, F. T.; Sordat, B. (2000): Tumor cell budding and laminin-5 expression in colorectal carcinoma can be modulated by the tissue micro-environment. In: *International journal of cancer. Journal international du cancer*, Jg. 88, H. 5, S. 708–717.
- (161) Speel, E. J.; Scheidweiler, A. F.; Zhao, J.; Matter, C.; Saremaslani, P.; Roth, J. et al. (2001): Genetic evidence for early divergence of small functioning and nonfunctioning endocrine pancreatic tumors: gain of 9Q34 is an early event in insulinomas. In: *Cancer research*, Jg. 61, H. 13, S. 5186–5192.
- (162) St Guily, Jean Lacau; Borget, Isabelle; Vainchtock, Alexandre; Rémy, Vanessa; Takizawa, Claire (2010): Head and neck cancers in France: an analysis of the hospital medical information system (PMSI) database. In: *Head & neck oncology*, Jg. 2, S. 22. Online verfügbar unter doi:10.1186/1758-3284-2-22.
- (163) Stallmach, Ingrid; Zenklusen, Petra; Komminoth, Paul; Schmid, Stephan; Perren, Aurel; Roos, Malgorzata et al. (2002): Loss of heterozygosity at chromosome 6q23-25 correlates with clinical and histologic parameters in salivary gland adenoid cystic carcinoma. In: *Virchows Archiv : an international journal of pathology*, Jg. 440, H. 1, S. 77–84.
- (164) Stanyon, Clement A.; Liu, Guozhen; Mangiola, Bernardo A.; Patel, Nishi; Giot, Loic; Kuang, Bing et al. (2004): A Drosophila protein-interaction map centered on cell-cycle regulators. In: *Genome biology*, Jg. 5, H. 12, S. R96. Online verfügbar unter doi:10.1186/gb-2004-5-12-r96.
- (165) Steneberg, P.; Englund, C.; Kronhamn, J.; Weaver, T. A.; Samakovlis, C. (1998): Translational readthrough in the *hdc* mRNA generates a novel branching inhibitor in the *drosophila* trachea. In: *Genes & development*, Jg. 12, H. 7, S. 956–967.
- (166) Steneberg, P.; Hemphälä, J.; Samakovlis, C. (1999): Dpp and Notch specify the fusion cell fate in the dorsal branches of the *Drosophila* trachea. In: *Mechanisms of development*, Jg. 87, H. 1-2, S. 153–163.
- (167) Steneberg, P.; Samakovlis, C. (2001): A novel stop codon readthrough mechanism produces functional Headcase protein in *Drosophila* trachea. In: *EMBO reports*, Jg. 2, H. 7, S. 593–597. Online verfügbar unter doi:10.1093/embo-reports/kve128.
- (168) Stiewe, Thorsten (2007): The p53 family in differentiation and tumorigenesis. In: *Nature reviews. Cancer*, Jg. 7, H. 3, S. 165–168. Online verfügbar unter doi:10.1038/nrc2072.

- (169) Stoltzfus, Patricia; Salo, Sirpa; Eriksson, Elina; Aspenblad, Ulla; Tryggvason, Karl; Auer, Gert; Avall-Lundqvist, Elisabeth (2004): Laminin-5 gamma2 chain expression facilitates detection of invasive squamous cell carcinoma of the uterine cervix. In: *International journal of gynecological pathology : official journal of the International Society of Gynecological Pathologists*, Jg. 23, H. 3, S. 215–222.
- (170) Suter, Valérie G. A.; Morger, Reto; Altermatt, Hans Jörg; Spieler, Peter; Bornstein, Michael M. (2008): [Oral erythroplakia and erythroleukoplakia: red and red-white dysplastic lesions of the oral mucosa--part 2: cytodiagnosis, pathogenesis, therapy, and prognostic aspects]. In: *Schweizer Monatsschrift für Zahnmedizin = Revue mensuelle suisse d'odonto-stomatologie = Rivista mensile svizzera di odontologia e stomatologia / SSO*, Jg. 118, H. 6, S. 510–518.
- (171) Tang, Wei; Dodge, Michael; Gundapaneni, Deepika; Michnoff, Carolyn; Roth, Michael; Lum, Lawrence (2008): A genome-wide RNAi screen for Wnt/beta-catenin pathway components identifies unexpected roles for TCF transcription factors in cancer. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jg. 105, H. 28, S. 9697–9702. Online verfügbar unter doi:10.1073/pnas.0804709105.
- (172) Tazi, Jamal; Bakkour, Nadia; Stamm, Stefan (2009): Alternative splicing and disease. In: *Biochimica et biophysica acta*, Jg. 1792, H. 1, S. 14–26. Online verfügbar unter doi:10.1016/j.bbadis.2008.09.017.
- (173) Temporini, Caterina; Calleri, Enrica; Massolini, Gabriella; Caccialanza, Gabriele: Integrated analytical strategies for the study of phosphorylation and glycosylation in proteins. In: *Mass spectrometry reviews*, Jg. 27, H. 3, S. 207–236. Online verfügbar unter doi:10.1002/mas.20164.
- (174) Toledo, Franck; Wahl, Geoffrey M. (2006): Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. In: *Nature reviews. Cancer*, Jg. 6, H. 12, S. 909–923. Online verfügbar unter doi:10.1038/nrc2012.
- (175) Toyoshima, T.; Koch, F.; Kaemmerer, P.; Vairaktaris, E.; Al-Nawas, B.; Wagner, W. (2009): Expression of cytokeratin 17 mRNA in oral squamous cell carcinoma cells obtained by brush biopsy: preliminary results. In: *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*, Jg. 38, H. 6, S. 530–534. Online verfügbar unter doi:10.1111/j.1600-0714.2009.00748.x.
- (176) Toyoshima, Takeshi; Vairaktaris, Eleftherios; Nkenke, Emeka; Schlegel, Karl Andreas; Neukam, Friedrich Wilhelm; Ries, Jutta (2008): Cytokeratin 17 mRNA expression has potential for diagnostic marker of oral squamous cell carcinoma. In: *Journal of cancer research and clinical oncology*, Jg. 134, H. 4, S. 515–521. Online verfügbar unter doi:10.1007/s00432-007-0308-8.
- (177) Trombetta, E. Sergio; Parodi, Armando J. (2003): Quality control and protein folding in the secretory pathway. In: *Annual review of cell and developmental biology*, Jg. 19, S. 649–676. Online verfügbar unter doi:10.1146/annurev.cellbio.19.110701.153949.
- (178) van Alphen, R. J.; Wiemer, E. A. C.; Burger, H.; Eskens, F. A. L. M. (2009): The spliceosome as target for anticancer treatment. In: *British journal of cancer*, Jg. 100, H. 2, S. 228–232. Online verfügbar unter doi:10.1038/sj.bjc.6604801.

- (179) van Houten, Viola M. M.; Tabor, Maarten P.; van den Brekel, Michiel W. M.; Kummer, J. Alain; Denkers, Fedor; Dijkstra, Janny et al. (2002): Mutated p53 as a molecular marker for the diagnosis of head and neck cancer. In: *The Journal of pathology*, Jg. 198, H. 4, S. 476–486. Online verfügbar unter doi:10.1002/path.1242.
- (180) van Oijen, M. G.; Slootweg, P. J. (2000): Oral field cancerization: carcinogen-induced independent events or micrometastatic deposits? In: *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, Jg. 9, H. 3, S. 249–256.
- (181) Venables, Julian P. (2004): Aberrant and alternative splicing in cancer. In: *Cancer research*, Jg. 64, H. 21, S. 7647–7654. Online verfügbar unter doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1910.
- (182) Venables, Julian P. (2006): Unbalanced alternative splicing and its significance in cancer. In: *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, Jg. 28, H. 4, S. 378–386. Online verfügbar unter doi:10.1002/bies.20390.
- (183) Waddell, Nic (2008): Microarray-based DNA profiling to study genomic aberrations. In: *IUBMB life*, Jg. 60, H. 7, S. 437–440. Online verfügbar unter doi:10.1002/iub.57.
- (184) Wang, Zefeng; Burge, Christopher B. (2008): Splicing regulation: from a parts list of regulatory elements to an integrated splicing code. In: *RNA (New York, N.Y.)*, Jg. 14, H. 5, S. 802–813. Online verfügbar unter doi:10.1261/rna.876308.
- (185) Weaver, T. A.; White, R. A. (1995): headcase, an imaginal specific gene required for adult morphogenesis in *Drosophila melanogaster*. In: *Development (Cambridge, England)*, Jg. 121, H. 12, S. 4149–4160.
- (186) Werner, J. A.; Rathcke, I. O.; Mandic, R. (2002): The role of matrix metalloproteinases in squamous cell carcinomas of the head and neck. In: *Clinical & experimental metastasis*, Jg. 19, H. 4, S. 275–282.
- (187) Wong, Kwong-Kwok; Tsang, Yvonne T. M.; Chang, Yi-Mieng; Su, Jack; Di Francesco, Angela M.; Meco, Daniela et al. (2006): Genome-wide allelic imbalance analysis of pediatric gliomas by single nucleotide polymorphic allele array. In: *Cancer research*, Jg. 66, H. 23, S. 11172–11178. Online verfügbar unter doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-2438.
- (188) Worsham, Maria J.; Chen, Kang Mei; Tiwari, Nivedita; Pals, Gerard; Schouten, Jan P.; Sethi, Seema; Benninger, Michael S. (2006): Fine-mapping loss of gene architecture at the CDKN2B (p15INK4b), CDKN2A (p14ARF, p16INK4a), and MTAP genes in head and neck squamous cell carcinoma. In: *Archives of otolaryngology--head & neck surgery*, Jg. 132, H. 4, S. 409–415. Online verfügbar unter doi:10.1001/archotol.132.4.409.
- (189) Xing, E. P.; Nie, Y.; Song, Y.; Yang, G. Y.; Cai, Y. C.; Wang, L. D.; Yang, C. S. (1999): Mechanisms of inactivation of p14ARF, p15INK4b, and p16INK4a genes in human esophageal squamous cell carcinoma. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, Jg. 5, H. 10, S. 2704–2713.

- (190) Yamakawa-Kakuta, Yoshiko; Kawamata, Hitoshi; Doi, Yutaka; Fujimori, Takahiro; Imai, Yutaka (2009): Does the expression of HPV16/18 E6/E7 in head and neck squamous cell carcinomas relate to their clinicopathological characteristics? In: International journal of oncology, Jg. 35, H. 5, S. 983–988.
- (191) Yates, John R.; Gilchrist, Annalyn; Howell, Kathryn E.; Bergeron, John J. M. (2005): Proteomics of organelles and large cellular structures. In: Nature reviews. Molecular cell biology, Jg. 6, H. 9, S. 702–714. Online verfügbar unter doi:10.1038/nrm1711.
- (192) Zhang, L.; Cheung, K. J.; Lam, W. L.; Cheng, X.; Poh, C.; Priddy, R. et al. (2001): Increased genetic damage in oral leukoplakia from high risk sites: potential impact on staging and clinical management. In: Cancer, Jg. 91, H. 11, S. 2148–2155.
- (193) Zhao, Jia; Patwa, Tasneem H.; Lubman, David M.; Simeone, Diane M. (2008): Protein biomarkers in cancer: natural glycoprotein microarray approaches. In: Current opinion in molecular therapeutics, Jg. 10, H. 6, S. 602–610.
- (194) Zhao, Yan-Yang; Takahashi, Motoko; Gu, Jian-Guo; Miyoshi, Eiji; Matsumoto, Akio; Kitazume, Shinobu; Taniguchi, Naoyuki (2008): Functional roles of N-glycans in cell signaling and cell adhesion in cancer. In: Cancer science, Jg. 99, H. 7, S. 1304–1310. Online verfügbar unter doi:10.1111/j.1349-7006.2008.00839.x.

8 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name:	Maximilian Johann Krinner
Geburt:	04.07.1985 in Straubing
Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	Deutsch
Adresse:	Amselfinger Str. 26 94315 Straubing

Schulausbildung:

09/1991 – 07/1995	Grundschule Straubing – Ittling
09/1995 – 06/2004	Johannes-Turmair-Gymnasium in Straubing

Studium:

10/2004 – 03/2010	Studium der Zahnmedizin an der Universität Regensburg
09/2005	Naturwissenschaftliche Vorprüfung
04/2007	Zahnärztliche Vorprüfung
03/2010	Zahnärztliche Prüfung
03/2010	Approbation als Zahnarzt

Arbeit:

seit 09/2010	Vorbereitungsassistent in der Praxis Dr. Holger Klinge & Walter Wanninger in Straubing
--------------	---

9 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert für die Möglichkeit an der Klinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie an der Universität Regensburg zu promovieren. Er gab mir die Möglichkeit auf höchstem Niveau an der aktuellen Forschung teilzuhaben und betreute diese Arbeit.

Besonders bedanke ich mich bei Herrn Dr. Albert Dowejko für die wissenschaftliche Unterstützung dieser Arbeit. Durch seine freundliche und hilfsbereite Art unterstützte er mich während der ganzen Phase der molekulargenetischen Experimente sowie deren Auswertung. Bei auftretenden Fragen konnte ich mich jederzeit an ihn wenden.

Ferner danke ich Herrn Dr. Richard Bauer und Karin Bauer, die mir bei Fragen immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

Auch möchte ich mich bei allen weiteren Mitarbeitern im Biopark Regensburg bedanken für das kollegiale Miteinander, was zum einen die wissenschaftliche Arbeit erleichterte sowie zum anderen auch viel Spaß an der täglichen Arbeit bereitete.